Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand Prof. Dr. O. Schultze).

Über den Bau des Plasmas der niedersten Tiere.

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi

verfaßt und der hohen Medizinischen Fakultät
der Kgl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. et phil. Paul Vonwiller,
Prosektor am anatomischen Institut.

Würzburg 1918.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand Prof. Dr. O. Schultze).

Über den Bau des Plasmas der niedersten Tiere.

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi

verfaßt und der hohen Medizinischen Fakultät
der Kgl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. et phil. Paul Vonwiller,
Prosektor am anatomischen Institut.

Würzburg 1918.

Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Inhalt.

I. Einleitung.
II. Technik.
III. Bau des Plasmas.
1. bei *Amoeba proteus*,
2. bei *Pelomyxa palustris*,
3. bei *Actinosphaerium eichhorni*,
4. bei *Aethalium septicum*,
5. bei *Plasmodiophora brassicae*.
IV. Zusammenfassung.
V. Vorarbeiten zu einer Fauna der Protozoen von Würzburg und Umgebung.
VI. Literatur.
VII. Tafelerklärung.

I. Einleitung.

Bei Überlegungen über Abstammung und Systematik der ganzen Tierreihe pflegt man heute von denjenigen auszugehen, die man, wohl mit Recht, für die niedrigsten hält, von den Amöben und verwandten Arten.

Aber wir müssen doch bedenken, daß vermutlich auch diese niedersten Tiere seit ihrer Entstehung gewisse Fortschritte in ihrem Bau gemacht haben.

DARWIN (78) äußert sich darüber folgendermaßen: „Und wirklich lehrt uns die Geologie, daß einige der niedrigsten Formen, wie Infusorien und Wurzelfüßler (Rhizopoden) bereits seit unendlichen Zeiten beinahe auf ihrer gegenwärtigen Organisationsstufe verharren. Dennoch wäre es voreilig, anzunehmen, daß die meisten der vielen jetzt vorhandenen niederen Formen seit den ersten Regungen des Lebens in keiner einzigen Beziehung vollkommener geworden seien; denn jeder Naturforscher, der jemals derartige Wesen, die jetzt für recht tief auf der Stufenleiter stehend gehalten werden, anatomisch untersucht hat, muß über ihre wunderbare und prächtige Organisation erstaunt gewesen sein" (S. 132).

Zu beachten sind auch die Ausführungen von PASCHER (94), wonach amöbenähnliche Organismen durch rückschreitende Entwicklung aus höheren Formen entstehen können.

Andererseits bilden unsere niedrigsten Formen wohl den besten Ausgangspunkt für Betrachtungen über den Bau des Protoplasmas.

Jedoch muß man sich darüber verwundern, daß, obgleich also hier ein besonders wichtiger Formenkreis vorliegt, woran die weitgehendsten Schlüsse geknüpft werden, der feinere Bau seines Plasmas erst sehr unvollständig bekannt geworden ist, und nur eine kleinere Anzahl von Forschern sich damit abgegeben haben. Das wird teilweise durch die Schwierigkeit der Untersuchungen erklärt und zum anderen Teil vielleicht durch die irrtümliche Annahme, daß alles Erforschbare an diesen Wesen schon bekannt sei. Dies trifft aber nicht zu. Vieles ist noch zu erforschen und manches scheinbar Bekannte besser zu deuten. Der Bau des Plasmas der niedersten Tiere ist viel komplizierter als man gewöhnlich glaubt.

Was die Schwierigkeiten der Untersuchung anlangt, so lassen sie sich bei geeigneten Methoden teilweise überwinden, und die moderne Technik hat manche Fortschritte erlaubt, so wie es GREEFF (10), auf dessen zahlreiche ausgezeichneten Arbeiten wir wiederholt zurückkommen werden, voraussah; er sagt in seinen Studien über Protozoen (1888) S. 9: „Ich glaube in der Tat, daß hier ein reiches und fruchtbringendes Feld der zukünftigen Forschung über die Constitution des Protoplasmas und der Zelle sich eröffnet, zumal wenn es gelingt, die bisherigen optischen Hilfsmittel noch zu verstärken, da die Untersuchung meist an der Grenze des Sichtbaren sich bewegt."

Diese Fortschritte und die dadurch gewonnenen Ergebnisse er-

lauben dann wieder, früher gewonnene, aber teils vergessene oder unrichtig gedeutete Beobachtungen, die in der Fachliteratur niedergelegt sind, zu Ehren zu ziehen und in systematische Ordnung zu bringen.

Bekanntlich setzen sich auch die einfachsten Tiere aus Kern und Zelleib zusammen. So zeigen die im folgenden eingehender untersuchten Formen in allen bisher bekannt gewordenen Zuständen Kerne und Protoplasma. Dem Zug der Zeit folgend hat man aber in neuerer Zeit vorwiegend den Bau der Kerne untersucht (Gruber, Carter, Prowazek, Hertwig usw.). Die Kerne scheinen im Ruhezustand bei allen untersuchten Arten eine ganz bestimmte Form zu besitzen mit nach ständigen Regeln verteilten Bestandteilen. Daher bilden sie eines der wichtigsten Merkmale zur Bestimmung und systematischen Einordnung der niedersten Tiere, besonders der Amöben (vgl. auch Wasielewski und Kühn (30)).

Amoeba proteus besitzt in der Regel einen einzigen Kern von typischer Form, die in Doflein's Handbuch und bei Awerinzew gut wiedergegeben ist.

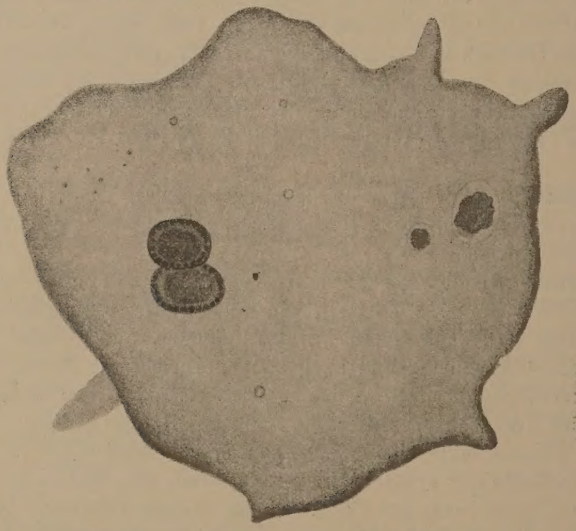
Andere Amöben besitzen andere Kernformen und oft mehrere bis viele Kerne, wie etwa die *Amoeba nobilis* Penard, zu welcher Art nach Herrn Penard's eigener, auf Einsicht meiner Präparate begründeter und auch meiner Ansicht die früher von mir untersuchte vielkernige Amöbe gehört. Zahl, Größe und Anordnung der Teile sind ganz anders als bei *Amoeba proteus*. Ebenso ist das Plasma in gewissen Einzelheiten verschieden.

Nun teilte mir Fräulein Carter brieflich mit, daß sie auf Grund eigener Studien und der Untersuchung meiner Präparate sich die Ansicht gebildet habe, daß meine vielkernigen Amöben auch zur *Amoeba proteus* gehören. Wenn dies richtig sein sollte, so würde man also annehmen müssen, daß bei der Kernvermehrung der typische Kernbau bei *Amoeba proteus* sich ändere. Ohne dies nun grundsätzlich ablehnen zu wollen, möchte ich es doch für unwahrscheinlich halten.

Ich fand neuerdings zweimal zweikernige *Amoeba proteus*, von denen ich eine hier abbilde, und woran die typischen Proteuskerne deutlich zu erkennen sind (Textfig. A, vgl. auch Greeff b S. 138). Damit wäre denn so viel sicher, daß wenigstens zwei typische Proteuskerne im gleichen Tier nebeneinander bestehen können. (Weiteres über Kernfragen siehe bei

Schubotz.) — Doch soll sich die vorliegende Arbeit nur nebenbei mit dem Bau der Kerne beschäftigen und ihr Hauptuntersuchungsgegenstand der Zelleib sein.

Denn während es nach den Untersuchungen von Nägler, Vahlkampf, Carter (7), Doflein usw. sicher ist, daß die normale Kernteilung der Amöben nach einer bestimmten Teilungsart vor sich geht, welche der Kernteilung anderer Protozoen und der Metazoen verwandt ist, sind wir über den Bau des Plasmas im ganzen viel weniger eingehend unterrichtet und wollen uns gleich diesem Gegenstande zuwenden.



Textfig. A. *Amoeba proteus* mit 2 Kernen.

Das Plasma scheint unmittelbarer von der nächsten Umgebung des Körpers beeinflußt zu werden, als der im Innern gelegene Kern.

Seine Grenzschicht ist in Berührung mit der Umwelt. Pseudopodien ragen in die Umgebung hinein, Nahrungskörper werden in das Innere aufgenommen, die Reste wieder ausgestoßen, die pulsierende Blase entleert Flüssigkeit nach außen, auch bei mit einer dicken Haut versehenen Amöben (Penard, 1904), Vitalfarbstoffe dringen hinein und setzen sich auf den verschiedensten Inhaltskörpern fest.

Deshalb war es besonders spannend, Vertreter der drei großen Lebenstypen: frei, saprophytisch und parasitisch lebender niederster Tiere auf den Bau ihres Plasmas zu untersuchen und das Gemeinsame und das Besondere daran näher kennen zu lernen; überdies konnte *Aethalium septicum* in allen Formen seines Lebenszyklus untersucht werden.

Untersucht wurden:

Amoeba proteus Pall.
Pelomyxa palustris Greff
Actinosphaerium eichhorni Ehrbg.
Aethalium septicum (= Fuligo varians)
Plasmodiophora brassicae Woron.

sowie einzelne andere Protozoen (*Volvox*, *Frontonia*, *Paramaecium*) und Hefepilze.

Dann galt es ferner Stellung zu nehmen zu den bisher vertretenen Lehren vom Bau des Protoplasmas, besonders Bütschli's Wabentheorie und der Mitochondrien-Sphaeroplastenlehre der neueren Forscher, welch letztere noch nicht in weitere Kreise der Protozoenforscher gedrungen ist, so daß in dem sonst überaus reichhaltigen Buch von Doflein davon überhaupt nicht die Rede ist.

Mit größter Vorsicht verwendet, dürften dann die Ergebnisse dazu dienen, zu entscheiden, was wesentlich und was Zutat, was typisch, allgemein gültig und vielleicht auch was phylogenetisch älter und was später hinzu erworben sei. Nur was allen Amöben und anderen niedersten Tieren gemeinsam ist, dürfte mit einiger Sicherheit als schon ursprünglich vorhanden gewesen gelten.

II. Technik.

A. Allgemeines.

Es wurde das Hauptgewicht auf die Beobachtung der lebenden Tiere im ungefärbten und lebendgefärbten Zustand gelegt. Nur was im lebenden Zustand sichtbar war, wurde an fixierten Präparaten als im Leben sicher vorhanden angenommen.

Die Beobachtung der lebenden kleineren Objekte geschah mit Lupe und Mikroskop, in Schalen und auf dem Objektträger, im hängenden Tropfen und zwischen Deckglas und Objektträger bei gestütztem Deckglas oder ohne solches bei geringerem oder stärkerem Druck.

Daß Deckglasdruck allein schon genügt um, ganz gegen Erwartung nicht ein genaueres Bild zu geben, sondern schon ein bedeutend verzerrtes, hat FAURÉ (80) gezeigt. In diesem Fall verwandeln sich die Sphäroplasten in gewissen Protozoen in Vakuolen und täuschen ein Wabenwerk vor, das aber eben als pathologische Erscheinung gewertet werden muß (z. B. S. 486).

Also kann man nur durch vielfältige, immer wieder abgeänderte Untersuchungsarten einen richtigen Eindruck vom lebenswahren Normalzustand des Zelleibes bekommen. Durch Vergleichen der Beobachtungen des lebenden ungefärbten, lebend gefärbten absterbenden, toten, fixierten, ganzen oder in Schnitte zerlegten und gefärbten Tieres wird es möglich sein, ein immer treueres Bild von den wahren Verhältnissen zu bekommen.

Ich habe auch mit Erfolg versucht, die Vorteile verschiedener Methoden am gleichen Objekt zu vereinigen, z. B. eine Vitalfärbung zu konservieren und noch eine der gewöhnlichen Kernfärbungen daraufzusetzen, — ein Verfahren, das im Gebiet der Urtiere neu sein dürfte und manche Aussichten zu weiterer Ausgestaltung enthält.

B. Fixierung.

Zur Fixierung verwendete ich mit Vorteil zur Erhaltung der äußeren Form, zur Vorbereitung der Kernfärbung usw. Alcohol absolutus (bei Amöben, *Aethalium*). Zur Fixierung der Lebendfärbung kommt vorläufig hauptsächlich Sublimat und Sublimatosmiumsäure in Betracht. Zur feineren Analyse des Plasmas am fixierten Tier eignen sich besonders Osmiumsäure 2%, Osmiumbichromat (1:4), Formol, Formolbichromat, Formolalkohol. Nach Behandlung mit Formolalkohol kann man die Schnitte nachbeizen mit Kalibichromat, wenn nötig bei erhöhter Temperatur.

C. Die Färbung.

Es wurden zwei Arten der Färbung in ausgedehntem Maße verwendet:

I. die Lebendfärbung.

II. die gewöhnlichen Färbemethoden.

Über die Lebendfärbung wird im Kapitel *Actinosphaerium* und beiläufig auch in den übrigen speziellen Abschnitten berichtet.

Von den gewöhnlichen Färbemethoden wurden verwandt:

a) die allgemein gebräuchlichen Kern- und Plasmafärbungen: Alaunkarmin, Hämatoxylin-Eosin usw.,

b) elektive Plasmafärbungen, besonders Mitochondrienmethoden:

1. Hämateinfärbung nach O. Schultze (92),
2. Heidenhain's Eisenhämatoxylinmethode,
3. Kull's Mitochondrienmethode (86).

Gefärbt wurden Ganzpräparate und Schnitte.

D. Einbettung.

Zur Einbettung kleiner Tiere (Amöben, Actinosphärien usw.) bediente ich mich zweier Methoden.

Die erste lehnt sich an die in (29) meiner früheren Arbeit über den Bau der Amöben (Seite 11) beschriebene an. Anstatt der ungeformten Salamanderhautstückchen bediente ich mich aber der abgestoßenen Haut von den Füßen des Tieres und spritzte mit einer feinen Pipette die Amöben in die Finger dieses Handschuhs. Dann wurde das proximale Ende mit Pinzette abgeklemmt, abgeschnitten und der ganze Fingerling mit Inhalt aus dem verdünnten Alkohol in Alcohol absolutus übertragen, der die Salamanderhaut steif macht, so daß man das Objekt mit Pinzette in Intermedium und Paraffin bringen kann.

Die zweite, einfachere Methode lehnt sich an die Schultze'sche Kollodiumparaffinmethode an. Die nach den verschiedensten Methoden vorbehandelten Tiere werden nach dreimaliger Behandlung mit Alcohol absolutus in ein Gemisch gleicher Teile von Alcohol absolutus und Kollodium gebracht. Ein Tropfen Paraffin wird auf einen Objektträger gesetzt und in der Mitte des Tropfens mit einem kleinen Löffel oder der Spitze eines Skalpells eine Höhle angebracht. Das überflüssige Paraffin wird entfernt, so daß nur ganz dünne Wände stehen bleiben. Ein Tropfen Kollodiumalkohol mit den Objekten wird mit Pipette in diesen Trichter gesetzt und unter der Lupe nachgesehen, bis die anfänglich in wirbelnder Bewegung sich drehenden Objekte sich gesetzt haben. Dann wird der Trichter vom Objektträger abgelöst, Chloroformdämpfe ausgesetzt, in flüssiges Chloroform übertragen und mit Paraffin behandelt. Das flüssige Chloroform löst den Paraffintrichter auf und besorgt damit gleichzeitig den Übergang vom Chloroform zum Chloroformparaffin. Der gehärtete Kollodiumtropfen mit den eingeschlossenen Objekten wird mit dem Löffel weiter transportiert.

Andere Objekte wurden je nach Bedarf durch Chloroformparaffin oder auch direkt aus Chloroform in zweimal gewechseltes Paraffin vom Schmelzpunkt 45° und dann in solches vom Schmelzpunkt von 62° gebracht und in solchem ausgegossen und in fließendem Wasser abgekühlt. Der Aufenthalt im Paraffin wurde möglichst kurz gestaltet, bei kleinen Objekten etwa $^1/_4$ Stunde.

Alle Stufen des Verfahrens wurden nach Möglichkeit mikroskopisch überwacht.

Die eingebetteten Objekte wurden mit einem Mikrotom von Schanze in Schnitte von 5—2 μ zerlegt, mit Eiweißglycerin oder Nelkenölkollodium aufgeklebt und gefärbt.

E. Einschluß.

Die Präparate wurden in Glycerin, Apathy's Gemisch,[1]) Euparal oder Balsam eingeschlossen.

III. Der Bau des Plasmas der Amöben.

Das Material entstammte den Aquarien des zoologischen Instituts.

Die nahen Beziehungen des Plasmas zur Außenwelt machen die Frage seiner äußeren Begrenzung zu einer Hauptfrage. Sind die Amöben von einer äußeren Haut eingeschlossen?

Das ist bis jetzt für *Amoeba proteus* und viele verwandte Formen unentschieden. Doflein behauptet in seinem Lehrbuch (S. 561): „Die Amöben sind stets nackt, d. h. sie besitzen weder Membranen noch Hüllen oder Gehäuse." Nun kennt man aber, und in neuerer Zeit besonders durch die Arbeiten von Penard (22, 23) und Grosse-Allermann (15) eine ganze Gruppe von Amöben, die eine deutliche, dicke Haut besitzen, aus der man durch Druck den ganzen Inhalt auspressen kann, so daß sie als leerer Sack zurückbleibt. Es sind dies die sog. Erdamöben, *Amoeba terricola* und verwandte Arten.

Für das Vorhandensein einer allerdings viel dünneren und schwerer sichtbaren Haut bei Süßwasseramöben, die sich aber doch, ebenso wie bei *Terricola*, durch Auspressen des In-

[1]) 50 g Gummi arabic., 50 g Zucker, 50 ccm 1% Formollösung.

halts darstellen läßt, spricht sich Greeff (14) aus (f. Biol. Zentralbl. Bd. XII S. 375) und zwar so, daß ihre Gegenwart einen allgemeinen Charakter dieser Organismen bilde". — Ferner auch Auerbach (2) (S. 384, 418, 420 usw.), Bütschli (75), (Schäume S. 202—203).

Auf Grund meiner Beobachtungen schließe ich mich bestimmt dieser Ansicht an. Beim Zerdrücken von *Amoeba proteus* beobachtete man das Ausfließen des Plasmas nur an einzelnen Stellen, da wo eben die Haut durchlöchert worden ist. In dem zurückbleibenden Sack kann man oft noch einzelne Plasmabestandteile durch Druck auf das Deckglas hin- und herrollen und sie dabei an der Wand des Sackes anstoßen sehen. Überdies läßt sich die Haut zerquetschter Amöben leicht mit Methylenblau färben und die so gefärbten, mannigfach gefalteten Reste lassen sich durch Druck auf das Deckglas im Wasser hin- und herschwenken.

Penard hat beobachtet, daß sich bei *Amoeba terricola* die dicke Haut mit Methylenblau vital färben läßt.

Die gleiche Methode eignet sich auch für die Färbung der viel dünneren Haut der *Amoeba proteus* während des Lebens. Bringt man lebende *Amoeba proteus* in ziemlich konzentrierte Methylenblaulösung (mehrere Platinösen 1 % Lösung zu 1 Tropfen Wasser), so zeigt sich sogleich ein blauvioletter scharfer Rand um das ganze Tier. Zerdrückt man es, so kann man die Entleerung des ungefärbten Inhalts aus dem gefärbten Sack verfolgen, dessen Farbe an Falten und Runzeln, wo die Haut mehrfach übereinander liegt, noch besonders deutlich zu sehen ist. Die einzelnen Hautfetzen kann man durch Druck auf das Deckglas im umgebenden Wasser hin- und herbewegen und so von den verschiedensten Seiten betrachten. Auch mein verehrter Vorgesetzter Prof. O. Schultze überzeugte sich vom Vorhandensein einer Haut bei dieser Amöbenart.

So muß es nach meiner Ansicht für sicher gelten, daß *Amoeba proteus* eine dünne, sehr elastische, vital und sofort nach dem Zerquetschen mit Methylenblau färbbare Haut regelmäßig besitzt.

Wenn damit für *Amoeba proteus* das Vorhandensein einer Haut sichergestellt ist, so erhebt sich die weitere Frage, ob und wie sie für Stoffe ihrer Umgebung durchlässig sei. Daß sie bei *Amoeba proteus* z. B. für gewisse Vitalfarbstoffe leicht durchlässig ist (z. B. für Neutralrot, Bismarckbraun), geht aus den Beobachtungen früherer Forscher und aus meinen eigenen mit Sicherheit hervor.

Daß sogar die dicke Haut der Erdamöben ebenfalls

leicht durchlässig ist, z. B. für Neutralrot, soll im folgenden gezeigt werden. Fig. 1 (Taf. 1) zeigt das Bild einer von mir mit Neutralrot gefärbten *Amoeba terricola*, die ich von Herrn PENARD liebenswürdigerweise geschenkt erhalten hatte. Wir sehen, daß sich im Innern zahlreiche Inhaltskörper gefärbt haben [Nahrungsballen, „Tröpfchen" mit darin enthaltenen Körnchen, vgl. GROSSE-ALLERMANN (15) (S. 226), ferner PENARD (22) S. 183 ff.].

Daß aber nicht nur diese weichen Häute der Amöben sondern auch die starren Membranen der Hefepilze für gewisse Stoffe leicht durchlässig sind, wollen wir später noch genauer untersuchen.

Schwieriger als die Feststellung des Vorhandenseins der äußeren Haut ist die Frage nach der Abgrenzung des Plasmas gegen den Kern. Besteht vielleicht hier eine innere Haut?

Ich neige zu dieser Ansicht; denn untersucht man zerquetschte Amöben, so trifft man oft zwischen Kern und Plasma einen Spalt-

Textfig. B. *Amoeba proteus.*

raum an, der Kern ist dabei scharf begrenzt, offenbar von seiner Kernmembran, ebenso wird aber der Spaltraum auf seiner äußeren Seite durch eine scharfe Linie abgegrenzt, die sich sogar unter Umständen mit Methylenblau etwas färben läßt. Zwischen dem Kern und dieser Grenzlinie bestehen zuweilen noch strangförmige Verbindungen (Textfigur B).

Nach Prenant (39) (Bd. I S. 91—94) bildet das Plasma feine Membranen zur Abgrenzung gegen alle Inhaltskörper, Kern, Vakuole, Einschlüsse usw. Man muß also nach dem Obigen zum mindesten den Verdacht äußern, daß eine solche innere Grenzmembran vorhanden sei. Awerinzew (4) (1907 S. 116) beschreibt bei *Amoeba proteus* und *Arcella vulgaris* eine protoplasmatische und eine eigentliche Kernmembran.

Nachdem wir uns so mit den äußeren und inneren Grenzen des Amöbenprotoplasmas bekannt gemacht haben, wollen wir uns dem Inhalt zuwenden. Dabei soll das Hauptaugenmerk auf die Plasmosomen, Sphäroplasten oder Mitochondrien gelenkt werden.

Aber ich möchte doch nicht unterlassen, außerdem auch noch über die anderen Inhaltskörper eine Reihe von Bemerkungen beizufügen, um einiges Neue mitzuteilen und frühere Angaben zu vervollständigen und andererseits das Verhältnis zu den Plasmosomen näher zu beleuchten.

Unter der Anleitung meines hochverehrten früheren Lehrers, Prof. Boveri, hatte ich zwei Süßwasseramöbenarten eingehender und mit verschiedenen Methoden untersucht, dabei auch die vermeintlich allbekannte Art *Amoeba proteus* (29) (Arch. f. Protistenkunde Bd. 28, 1913).

Als Fortsetzung jener Arbeit untersuchte ich Amöben auf den Rat meines hochverehrten Lehrers und Vorgesetzten Prof. Schultze besonders auf Plasmosomen (29) (Anat. Anzeiger 48. Bd. S. 485, 1915). Gestützt auf die Forschungen anderer Autoren und die beiden soeben genannten eigenen Arbeiten wollen wir jetzt noch weiter in den Gegenstand unserer Untersuchung eindringen.

Nahrungsvakuolen.

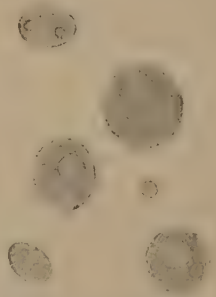
Die größten Inhaltskörper des Amöbenprotoplasmas pflegen, abgesehen von der maximal erweiterten kontraktilen Blase, die Nahrungsvakuolen zu sein. Ihre Gestalt und Funktion ist schon oft und eingehend, z. B. von Hofer (18) mit Bismarckbraunvitalfärbung, untersucht worden. Überdies sind die Vorgänge in den entsprechenden Gebilden bei *Paramaecium* in einer interessanten Arbeit von Nirenstein (69) und Kainsky mittels Neutralrotvitalfärbung verfolgt worden.

Ich kann nun hinzufügen, daß bei Amöben Neutralrot und Brillantkresylblau ganz ähnlich wirken, wie Bismarckbraun bei Amöben und Neutralrot bei Paramäcien. Es gelingt damit, den Körnchenbesatz der Nahrungsvakuolen zu färben. Dabei fiel mir auf, daß zuweilen diese Körnchen nicht regelmäßig in einer Reihe den Vakuolenrand umsäumen, sondern einseitig gehäuft im optischen Querschnitt als Halbmond die Vakuole nur teilweise umfassen (Textfigur C).

Eiweiskugeln.

Die nächst größeren Inhaltskörper sind die Eiweißkugeln, die aber auch in vielen kleineren Exemplaren bis herunter zu 1 μ Durchmesser vorkommen.

Textfig. C. Nahrungsvakuolen mit peripherem Körnchenbesatz.



Textfig. D. Eiweißkugeln. Beginnende Auflösung in verdünnter Kalilauge.

Sie sind am lebenden Plasma durchsichtig. Jedoch werden unter ihnen gelegene Inhaltskörper, z. B. Kristalle, nicht in ihrer wahren Gestalt sichtbar sondern nur verschwommen, weil die Eiweißkugel als Kugellinse wirkt, deren Brennpunkt für unsere Betrachtung ungünstig liegt.

Die Eiweißkugeln sind schon mannigfach untersucht (besonders auch von SCHUBOTZ (27) und auch in meiner früheren Arbeit behandelt worden (29). Auffallend ist ihre starke Färbung durch Hämatoxylin (Tafel 1, Fig. 2).

Mit den damals von mir angewandten Untersuchungsmethoden ließen sie sich nicht in einzelne Teile zerlegen. Unterdessen habe

ich aber beobachtet, daß bei der Einwirkung sehr verdünnter Kalilauge sich doch eine deutliche Scheidung in eine umhüllende Membran und darin eingeschlossenen Inhalt zeigen läßt. Ich wandte stark verdünnte (1 Tropfen 35 % Kalilauge auf 1 cm^3 Wasser) Kalilauge an und ließ sie auf lebende Amöben wirken. Sie platzen nach kurzer Zeit und das Plasma ergießt sich in die umgebende Flüssigkeit. Die Eiweißkugeln behalten vorläufig ihre Gestalt, platzen dann aber auch und verschwinden. Zuweilen aber bleibt ein durchsichtiges Häutchen nach dem Ausfließen des Inhalts noch einige Zeit bestehen. In günstigen Fällen beobachtet man auch wie der Lösungsprozeß im Innern der Kugel beginnt (Fig. D), indem ein scharf begrenzter, runder, sich vergrößernder Hohlraum entsteht, bis allmählich der ganze Inhalt gelöst ist und nur noch die leere Membran besteht.

Bemerkenswert ist auch das Verhalten gegen Essigsäure. 1 % Essigsäure greift die Eiweißkugeln an, indem ein meist exzentrisch gelegenes rundes Loch darin entsteht, das ungefähr die Hälfte des Durchmessers der ganzen Kugel mißt. Bei 10 % Essigsäure treten mehrere runde Höhlen in ihrem Innern auf (Fig. D). 50 bis 80 %ige und konzentrierte Essigsäure dagegen verändern die Eiweißkugeln nicht, und nach Behandlung mit konzentrierter Essigsäure wirkt auch die 10 %ige nicht mehr schädlich.

Wie schon aus den Andeutungen früherer Forscher und aus eigenen Beobachtungen zu vermuten war, bestehen also die Eiweißkugeln aus zwei Teilen, dem Inhalt und einer Membran, welche vielleicht ähnliche Bedeutung hat wie die oben beschriebene „plasmatische“ Kernmembran.

Kristalle.

Der Reihenfolge absteigender Größe der Inhaltskörper folgend gelangen wir nunmehr zu den Kristallen (vgl. auch bes. die Arbeit von Schubotz (27)).

Bei den gewöhnlichen Exemplaren, die ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, waren es scharfkantige, viereckige Doppelpyramiden mit abgestumpften Enden. In den früher hergestellten Präparaten war es mir nicht gelungen, sie zu konservieren. Unterdessen habe ich bemerkt, daß sie nach Fixierung mit gesättigter Sublimat-kochsalzlösung und nach Entwässerung mit Alkohol in Euparal erhalten bleiben. Prandtl (25) konnte die Kristalle nach Pikrinessigsäure-Boraxkarminbehandlung konservieren (b, S. 287).

In einer früheren Arbeit (1913) hatte ich eigentümliche mit gefärbter Flüssigkeit gefüllte Kugeln beschrieben, welche bei starker Neutralrotvitalfärbung an den Kristallen auftreten. Dasselbe Bild läßt sich auch mit Brillantkresylblau erzeugen.

Das Auftreten dieser Kugeln bedeutet wahrscheinlich schon eine Schädigung des Plasmas. Im normalen, ungefärbten Plasma sind sie nicht zu sehen (vgl. auch SCHUBOTZ S. 37). Fixiert man solche mit Brillantkresylblau vitalgefärbte Amöben mit Sublimatkochsalzlösung, so scheinen nach Verschwinden der flüssigkeitsgefüllten Kugeln die Kristalle tief violett.

Über die Entstehung der Kristalle läßt sich noch nichts Sicheres sagen. Ich will aber einige Beobachtungen mitteilen, welche geeignet sind anzudeuten, wie die Kristalle entstehen. In den Aquarien des zoologischen Instituts trat vereinzelt eine offenbar der *Amoeba proteus* nahe verwandte Form auf. Ihr Körperdurchmesser war etwa 300 μ, Kerndurchmesser etwa 40 μ, mit einem großen runden Binnenkörper vom Durchmesser von etwa 20 μ. Der Kernwand lagen, ganz ähnlich wie bei *proteus*, innen Chromatinkügelchen in einfacher, fortlaufender Schicht an. Im Plasma fehlten die Eiweißkugeln. Zahlreiche Sphäroplasten von etwa 1 μ Durchmesser durchsetzten das Plasma. Die meisten dieser Amöben enthielten einen großen ca. 80 μ im Durchmesser haltenden Bacillenballen im Plasma. Das merkwürdigste aber waren die Kristalle. Sie fielen sogleich durch ihre Größe auf (9—10 μ Länge, 5 μ Breite), überdies durch oft unregelmäßigen Rand. Zwar handelt es sich auch hier um Doppelpyramiden mit stumpfen oder auch spitzigen Enden, allein sie sind oft nicht vollständig; sondern bald der Seite bald dem Ende sitzt ein ungefähr halbkugeliges Gebilde auf von nicht kristallinischer Beschaffenheit. Man sieht auch halbe Kristalle, und zwar bald nur eine einfache Pyramide oder der Länge nach halbierte Doppelpyramiden, wobei an Stelle der fehlenden Hälfte das genannte Knöpfchen steht (Textfig. E). Nun gibt es ältere Angaben von GREEFF (10), wonach die Kristalle immer ein solches Knöpfchen besitzen sollen (GREEFF 10 S. 136 ff. u. d., S. 10).

Textfig. E. Kristalle mit „Knöpfchen".

Wir haben höchstwahrscheinlich die Organe vor uns, welche die Kristalle bilden, wobei vorläufig unentschieden bleiben muß, ob es sich um die von GREEFF beschriebenen Knöpfchen handelt. Das Gebilde ist mit Sublimat fixierbar und färbt sich dann, wie die Sphäroplasten mit Eosin. Leider erlaubte das zu knappe Material

noch keine weitere Erforschung des Zusammenhangs mit den Sphäroplasten. Aber ein Entstehen von Kristallen auf mitochondrialer Basis wäre nach Guillermond's (83) Untersuchungen über die Entstehung der Carotinkristalle nichts besonders Auffallendes. Nach Prandtl (25) entstehen sie aus Chromidien.

(Chemische Zusammensetzung siehe bei Schubotz (27).)

Sphäroplasten.

Damit kommen wir auf unserer absteigenden Reihe zu den Sphäroplasten (Plasmosomen, Mitochondrien).

Hier bewegen wir uns, scheinbar wenigstens, in einem neuen Gebiet. Das schon erwähnte, reichhaltige Lehrbuch von Doflein (77) berichtet nichts über diese Gebilde und die bisher erschienenen Arbeiten über den Gegenstand beschäftigen sich wenig mit Amöben.

Durchsucht man die früheren Schriften über Amöben, so stellt man allerdings fest, daß die von uns Sphäroplasten genannten Bildungen nicht unbekannt waren. Nur fehlten damals die Methoden und zum Teil theoretische Voraussetzungen, die uns heute die Untersuchung erleichtern und ihre Ergebnisse wertvoller machen, weil wir sie jetzt in bedeutungsvolleren Zusammenhang bringen können.

Von diesen älteren Arbeiten sind besonders zu erwähnen diejenige von Zoja (31), der fuchsinophile Körner bei *Amoeba limax* beschrieben und abgebildet hat (S. 242). Fauré-Fremiet (80) (1910) (S. 507) sah Sphäroplasten in lebenden, wahrscheinlich der *Amoeba gorgonia* nahestehenden Formen und stellte fest, daß sie sich mit Osmiumsäure grau färben. Neuestens hat Arndt (1) (1914) „Mitochondrien" in einer neuen *Amoeba chondrophora* gefunden. Überdies findet sich in der Literatur eine Angabe von Metcalf (1910), der in der Nähe der kontraktilen Blase von Amöben auffallend angeordnete Körner sah, die er nicht genau deuten konnte, die wir aber mit ziemlicher Sicherheit für Sphäroplasten ansehen dürfen.

Die wertvollsten Beobachtungen aber, namentlich am lebenden Tier, stammen unstreitig von Greeff (9–14). Leider sind sie etwas in Vergessenheit geraten, vielleicht weil sie keine die Einzelheiten des Plasmas anschaulich machenden Bilder enthalten und dadurch schwer verständlich sind (vgl. z. B. Grosse-Allermann (15) (S. 214)). Aber daß Greeff bei *Amoeba terricola* in den von ihm sog.

Elementarkörnern (d. S. 9, 12) (e. S. 606 u. 607) sicherlich die von uns als Sphäroplasten gedeuteten Gebilde gesehen hat, geht aus seiner Beschreibung unzweifelhaft hervor. In einer Anmerkung berichtet er, daß er sie auch bei *Amoeba proteus* gesehen habe ((12) S. 13 u. (13) S. 608).

Was METCALF (19, 20) schildert ist nun nicht eine Ausnahme, sondern bei *Amoeba proteus* durchaus die Regel. Wenn man mit genügender Blendung die Gegend der kontraktilen Blase von *Amoeba proteus* absucht, so kann man schon mit LEITZ Objekt 7 deutlich eine Zone schwach lichtbrechender, dicht beieinander liegender, ungefähr gleich großer Körner sehen, besonders deutlich wenn man den Tubus von der scharfen Einstellung auf den Vakuolenrand aus langsam hebt und die dünne Plasmaschicht zwischen Vakuole und Körperfläche untersucht. GREEFF schildert ebenfalls diesen Befund sehr anschaulich bei *Amoeba terricola* (GREEFF (12) S. 12, (13) S. 607).

Bei Immersion wird das Bild noch deutlicher. Man stellt auch leichte Verschiedenheiten in der Form fest. Die meisten Körner sind rundlich, einzelne unregelmäßig bis länglich. Durchsucht man den Zelleib, so findet man allenthalben, zuweilen bis in den hyalinen Saum der Pseudopodien hinein, ähnliche Körner verstreut. Es findet keine Anhäufung in der Nähe des Kernes statt. Durch ihren

Textfig. F. Textfig. G.

matten, graulichen Ton unterscheiden sie sich von den glänzenden, grünlichen Eiweißkugeln, deren kleinere und kleinste bis zur Größenordnung der Sphäroplasten herabsteigen und noch kleiner sind. Der durchschnittliche Durchmesser der Sphäroplasten beträgt 1 μ (Textfig. F a).

Auffallend ist die schon von METCALF gesehene Anordnung in einer dichten einreihigen Schicht am Rand der kontraktilen Blase. Wie er, so sah ich auch, wie bei Verkleinerung der

Vakuole dabei der vorher einreihige Sphäroplastenbesatz mehrreihig wurde.

Bei stark gepreßten Tieren weichen die Sphäroplasten seitlich aus und das Feld über der Vakuole zeigt nur noch hyalines Plasma. Beim Zerfallen der Amöben, z. B. durch Druck, habe ich bemerkt, daß die Sphäroplasten allerdings noch schwerer sichtbar werden, als sie es innerhalb des lebenden Tieres schon waren. Aber in dieser schattenhaften Gestalt bleiben sie stundenlang erhalten ohne ihre Gestalt zu verändern. In ihrem Innern können dabei winzige Körnchen (Textfig. G) auftreten, wie es auch Fauré-Fremiet bei seinen Untersuchungen fand. Daß sie aber sich in Vakuolen verwandeln, wie es dieser Forscher bei seinen Objekten besonders bei Paramäcien sah, habe ich bei den Amöben nie mit Sicherheit gesehen. Die Sphäroplasten der Amöben sind offenbar sehr formbeständig.

Die Sphäroplasten können fixiert und gefärbt werden. Osmiumsäure, Formol, Sublimat, Pikrinsäure, Silbernitrat usw. erhalten die Form der Gebilde. Fauré-Fremiet (80) wies schon bei anderen Protozoen auf ihr starkes Anziehungsvermögen für Eosin nach Osmiumfixierung hin. Das gilt auch für *Amoeba proteus*. Aber nicht nur nach Osmiumfixierung wird Eosin besonders von ihnen angezogen, sondern auch nach Fixierung mit zahlreichen anderen Mitteln, unter denen mir besonders die verdünnte Salpeter- und Phosphorsäure auffielen, und Sublimat.

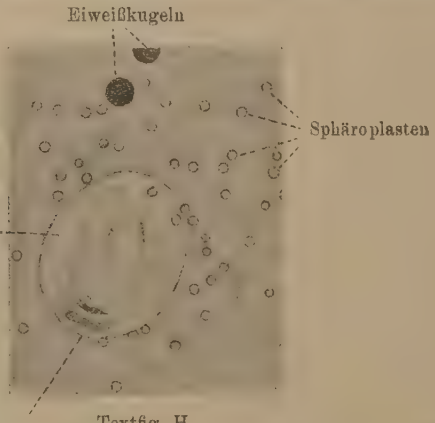
Außer für Eosin zeigen die Sphäroplasten unter ähnlichen Bedingungen auch eine auffallende Anziehungskraft für Hämatein (½ % in 70 % Alkohol). Auf diese Weise also, mit Eosin oder Hämatein kann man nach geeigneter Fixierung die sonst schwer sichtbaren Sphäroplasten schon am ganzen, noch nicht eingebetteten und in Schnitte zerlegten Tier scharf sichtbar machen, besonders wenn es in recht dünner Schicht ausgebreitet ist (Textfig. H).

Mittels der Schultze'schen Hämateinfärbung z. B. gelingt es auch, sie in Schnittpräparaten darzustellen (Textfig. Fa).

Zur Einbettung diente das oben beschriebene Schultze'sche Paraffinkollodiumverfahren, nachdem die Tiere vorher nach der Schultze'schen Hämateinfärbung behandelt worden waren. Außerdem wurden nicht vorgefärbte Amöben nach der Kull'schen Mitochondrienmethode gefärbt (Fig. 2). Bei beiden Verfahren ließen sich die Sphäroplasten in großer Zahl verstreut im ganzen Körper der Amöben nachweisen, und auch die eigentümliche Anordnung der Ge-

bilde am Rand der kontraktilen Blase wurde auf entsprechenden Schnitten wieder gefunden (Textfig. Fa).

Nun untersuchte ich das chemische Verhalten der Sphäroplasten, insbesondere auch um festzustellen, ob vielleicht eine Verwechslung mit kleineren Eiweißkugeln möglich sei, die ja von der gleichen Größenordnung sein können. Aber es erwies sich, daß die chemischen Eigenschaften dieser beiden Arten von Inhaltskörpern grundverschieden sind und eine Verwechslung durchaus ausgeschlossen ist. Es scheint keine Übergänge zwischen ihnen zu geben, und so verlockend es sein könnte, die wahrscheinlich Reservestoffe darstellenden Eiweißkugeln aus den Sphäroplasten abzuleiten, etwa wie es GUILLERMOND für die Stärkekörner usw. aus den Mitochondrien tun konnte, so muß doch vorläufig auf Grund von Beobachtungen jeder Zusammenhang in Abrede gestellt werden.



Textfig. H.

Gegen Farben verhalten sie sich völlig verschieden. Die Sphäroplasten ziehen Eosin an, die Eiweißkugeln Hämatoxylin; Hämatein färbt jene grau, diese schwarz; in KULL-Präparaten sind die Sphäroplasten gelbrot, die Eiweißkugeln hellblau (Tafel 1, Figur 3).

Das Verhalten gegen verdünnte Mineralsäuren (Salpeter-, Salzsäure) und Essigsäure ist entgegengesetzt. Die verdünnten Säuren lösen die Eiweißkugeln, während die Sphäroplasten erhalten bleiben; ähnlich verhalten sich verdünnte Laugen.

Somit ist eine Verwechslung ausgeschlossen; denn am lebenden, toten und fixierten Tier sind sie in jeder Hinsicht verschieden.

Kleinste Körner.

Nun gelangen wir zu den kleinsten mit unseren Hilfsmitteln sichtbaren Inhaltskörpern des Amöbenplasmas.

Diese kleinsten Körner gehören offenbar mindestens zwei verschiedenen Klassen an. Die eine kennen wir schon: es sind dieselben, die wir bei Vitalfärbung an Nahrungsvakuolen und zerstreut im Plasma fanden. Sie sind vielleicht mit den Eiweißkugeln verwandt. Weit getriebene Brillantkresylblauvitalfärbung zeigt die scheinbar frei schwimmenden Körner oft gruppiert zu mehreren um violett gefärbte Vakuolen, ähnlich wie dann je ein Kristall auch einer violetten Vakuole aufsitzt. (Über diese Körner vgl. Schubotz (27) S. 29.) Die zweite Art kleinster Körner scheint der Färbung unzugänglich zu sein. Es sind ganz kleine an der Grenze der Sichtbarkeit liegende, oft in Molecularbewegung befindliche, zuweilen kristallartig aufglänzende Körner. Bei Behandlung mit Osmiumsäure scheinen sie erhalten zu bleiben. Ihre Bedeutung ist unbekannt.

Kontraktile Blase und Zottenanhang.

Diese beiden nur zeitweise, das erste rhythmisch, das andere nur ausnahmsweise vorhandenen Organe unserer Amöben können wir hier kurz behandeln.

Von den räumlichen Beziehungen der Sphäroplasten zur Vakuole und von den bei früheren Autoren (Brandt) (5) erwähnten vitalen Färbungen des Organs ist an anderer Stelle schon die Rede. Übrigens bildet bei Beobachtung der Amöben zwischen Deckglas und Objektträger die dünne Plasmaschicht zwischen äußerer Haut und der ausgedehnten Vakuole ein besonders günstiges Feld zur Beobachtung von Plasmainhaltskörpern, da sie gewöhnlich so dünn ist, daß die Inhaltskörper höchstens in einer einzigen Schicht darin ausgebreitet werden. Verstärkung des Druckes durch Entziehung von Wasser mittels Fließpapierstreifen am Rand des Deckglases schiebt sie mehr seitwärts und läßt schließlich nur mehr Platz für hyalines Plasma zwischen äußerer Haut und Vakuolenhaut übrig.

Die Konservierung der Vakuole bietet keine Schwierigkeiten.

Der Zottenanhang, den ich diesmal nur wenige Male beobachten konnte, läßt sich fixieren z. B. mit Flemming's Gemisch, Sublimat. Nach Bütschli kann man ihn künstlich hervorrufen (75) (S. 202).

Commensalen, Parasiten.

Zum Schluß wollen wir noch einige nicht regelmäßig vorkommende Inhaltskörper des Amöbenplasmas erwähnen.

Bekannt sind Grünalgen, welche, ähnlich wie bei anderen Protozoen, das Plasma in reicher Zahl bewohnen können. Parasitische Insassen beschrieben PRANDTL (24) unter dem Namen *Allogromia*, ferner NÄGLER (21), CHATTON und BRODSKY (6). Außerdem können Bakterien in unzähligen Mengen verstreut oder in Haufen geballt (vgl. S. 26) im Plasma enthalten sein.

Schlußbetrachtung über den Bau des Plasmas bei den Amöben.

Wir haben im Vorhergehenden gesehen, daß das Plasma unserer Amöben eine große Anzahl geformter Teile enthält, die sich mannigfach unterscheiden und sich morphologisch und zum Teil auch chemisch kennzeichnen lassen. Die kleinsten Inhaltskörper erreichen die Grenze der Sichtbarkeit. Nichts hindert uns anzunehmen, daß auch jenseits dieser Grenze noch geformte Bestandteile im Plasma enthalten sein können, aus denen möglicherweise gewisse uns sichtbare Teile entstehen.

Dagegen gelingt es nicht mit Sicherheit einen vakuolären Bau dieses Plasmas im Normalzustand zu beobachten. Zwar finden wir allerdings an Schnitten viele Vakuolen außer den geformten Bestandteilen, und das hatte mich, vereint mit den Beobachtungen an vital gefärbten Tieren in einer früheren Arbeit, dazu geführt, diesen Zustand für den im normalen Leben vorhandenen zu halten. Jetzt neige ich aber eher zu der Ansicht, daß die bei der Vitalfärbung auftretenden Vakuolen an Kristallen und an einer Klasse kleinster Körner doch eher schon eine Schädigung vorstellen. Die Beobachtung FAURÉ's, daß bei starkem Druck Sphäroplasten zu Vakuolen werden können, mahnt zu größter Vorsicht, wenn diese Verwandlung auch bei meinen Beobachtungen nicht vorgekommen ist. Ob es möglich ist, die von BÜTSCHLI (75) z. B. für den Rand der kontraktilen Vakuole (S. 72, 1892) gegebene Beschreibung mit der obigen mit METCALF übereinstimmenden in Einklang zu bringen, scheint mir sehr zweifelhaft.

Die Lehre vom Wabenbau scheint mir für dieses Objekt nicht zu passen, und selbst wenn ein solcher vorhanden wäre, so scheint das Wesentliche doch eher auf der Seite der geformten

mehr oder weniger festen Teile zu liegen, die wir im Leben mit aller Sicherheit sehen können, wie ja überhaupt auf Grund neuerer Forschungen diesen Teilen wieder eine erhöhte Bedeutung zugeschrieben wird (Fauré-Fremiet (80) S. 473—475, 436 und Doflein (77) (1916).

2. Der Bau des Plasmas von *Pelomyxa palustris*.

In Wasser aus dem Teich des Gartens des zoologischen Instituts fand ich zeitweise eine reichliche Zahl von *Pelomyxa palustris*, ausnahmsweise auch einige ganz besonders große Tiere von mehreren Millimetern Durchmesser die im ausgebreiteten Zustand zwischen Deckglas und Objektträger einen Zentimeter Durchmesser hatten.

Bei Lupenvergrößerung waren sie grünlich gefärbt, was die Folge des Einschlusses vieler grüner Algenfäden war, die zum Teil aus dem Körper oder aus ein wenig ausgezogenen Pseudopodien heraushingen.

Bei schwacher Vergrößerung ließ sich das hyaline Ectoplasma, das an manchen Stellen die innere dunkel gefärbte Masse überragte, erkennen.

Bei mittlerer Vergrößerung fand sich das Ectoplasma oft auf weite Strecken mit Zotten besetzt, wie wir sie vom Zottenfortsatz der Amöben her kennen. Diese Zotten, die sich leicht z. B. mit Osmiumsäure fixieren lassen, waren in vereinzelten Fällen gegabelt (Fig. H). Im übrigen war das Ectoplasma auch bei Immersion hyalin und ohne sichtbare Innenstruktur. Daß es an der Oberfläche von einer Haut bekleidet ist, halte ich für sehr wahrscheinlich, wenn sie auch nicht so leicht nachzuweisen ist wie bei *Amoeba proteus*.

Dagegen erweist sich das Innenplasma als überaus reich an Einzelheiten, die wir zum Teil schon aus früheren Arbeiten her kennen, besonders aus derjenigen von Greeff (34). Ich zähle sie deshalb nur auf: Nahrungsvakuolen, Plasmavakuolen, Körnchen, Stäbchen, Sandkörner — dazwischen die Kerne. Die sog. Glanzkörper fehlten bei den kleineren Tieren. Aber bei näherer Untersuchung der Körnchen ließen sich neben den Stäbchen zwei verschiedene Arten unterscheiden:

1. Große, unregelmäßig runde, matte, schwerer sichtbare, an die Sphäroplasten der Amöben erinnernde und

2. häufigere, kleinere, runde hellglänzende.

Außerdem fanden sich in einem Teil der Plasmavakuolen in tanzender Bewegung befindliche schon von Greeff beschriebene Körnchen. Diese Vakuolen und ihre Körnchen gelang es, — außer dem Inhalt und der Flüssigkeit der Nahrungsvakuolen — mit Brillantkresylblau vital zu färben, während die anderen Plasmavakuolen ungefärbt blieben. Korotneff (36) beschreibt ebenfalls zwei verschiedene Arten von Plasmavakuolen bei *Pelomyxa*, die sich vielleicht mit den beiden hier genannten decken (S. 474).

Auf Schnitten war der Vakuolenbau des Endoplasmas gut erhalten. Dazwischen lagen Nahrungsvakuolen, Kerne, Körner und Stäbchen. Diese letzteren färbten sich nach Kull leuchtend rot. Bei mit Osmium behandelten Tieren färbten sich einzelne Körner schwarz, wahrscheinlich Fett. Die Sphäroplasten erwiesen sich im ganzen als recht schwer färbbar. Sie nehmen nach Behandlung mit verdünnter Salpetersäure oder 10% Phosphorsäure, nicht wie bei den Amöben, Eosin auf, auch nicht sogleich Hämatein nach Osmiumvorbehandlung. Dagegen gelang es sie in Heidenhain-Präparaten zu färben. (Über „Elementargranula" bei *Pelomyxa* vgl. auch Greeff (12) S. 13 Anmerkung).

Nachdem jetzt der Fortpflanzungskreis der *Pelomyxa* durch die Untersuchungen von Bott (33) und Tönniges (37) sicher bekannt geworden zu sein scheint, kann man daraus auch ersehen, daß der grobmaschige Bau des Entoplasmas der älteren Pelomyxen eine im Lauf des Lebens erst erworbene Eigenschaft ist, die den jüngsten Stadien fehlt. Bütschli (75) konnte am lebenden Objekt eine feine Wabenstruktur in den Zwischenbalken nicht deutlich sehen (S. 216), sondern erst bei Fixierung mit Pikrinschwefelosmiumsäure gelang es ihm sie darzustellen. Gould (35) fand an Schnitten in den Balken zwischen den größeren Waben wieder ein viel feinmaschigeres Wabenwerk. Aber es fehlen dort die zahlreichen körnigen Einschlüsse, die wir oben beschrieben haben und die offenbar einen ebenso wichtigen Bestandteil des Plasmas bilden wie die Waben, wenn sie für solche überhaupt noch Platz lassen sollten.

3. Der Bau des Plasmas von *Actinosphaerium eichhorni*.

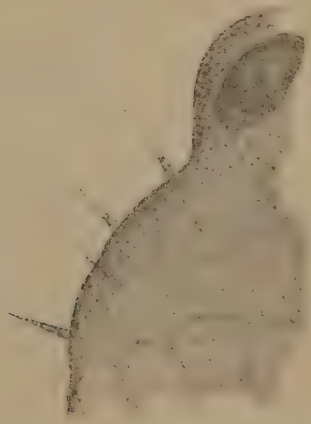
Das Material entstammte den Aquarien des zoologischen Instituts.

Doflein (17) kommt nach seinen mit Dunkelfeldbeleuchtung ausgeführten Beobachtungen zum Schluß, daß auch *Actinosphaerium*

„von einer allerdings sehr feinen Plasmahaut" begrenzt sei (S. 352, 1916).

Im übrigen hat dieses Plasma ausgesprochen vakuolären Bau. Die äußeren Vakuolen sind größer, die inneren kleiner. Zwischen den Vakuolen liegt in Form von Scheidewänden und Strängen das eigentliche Protoplasma, das auch in dünner Schicht die Oberfläche der äußeren Vakuolenschicht und der Strahlen bedeckt (vgl. M. Schultze (69) S. 29ff.). Hier, auf den Strahlen, auch an ihrem zwischen den äußeren Vakuolen gelegenen Teil, an der Oberfläche der äußeren Vakuolenschicht in ihren Scheidewänden, oft auch in der Grenzschicht zwischen Ecto- und Entoplasma, finden wir reichlich körnige Einschlüsse, die im Leben langsame Körnchenströmung erkennen lassen. Ein besonders günstiges Beobachtungsfeld bieten auch hier die kontraktilen und ebenso über den Rand vorragende Nahrungsvakuolen (Textfig. K).

Textfig. I.
Zottenfortsatz
von *Pelomyra palustris*.



Textfig. K. *Actinosphaerium* lebend, ungefärbt. Körnchen im oberflächlichen Plasma. Zeiss' Immers. 1/18.

Wir wollen versuchen, im Anschluß an die Arbeit von Borowsky (38) uns ein Bild zu machen von den verschiedenen und noch wenig bekannten körnigen Gebilden des Actinosphärienplasmas.

Er beschreibt (S. 261ff.):

I. Größere, bei tiefer Einstellung dunkle Körnchen, die sich vital mit Neutralrot rosa bis rot färben lassen. Ich kann dies be-

stätigen und füge hinzu, daß sie sich mit Brillantkresylblau violett färben lassen.

II. Sehr kleine, zum größten Teil auf der Oberfläche des Tieres zerstreute, stäbchenförmige, mit Neutralrot intensiv gefärbte Inhaltskörper. Bei meinen Versuchen fand ich sie mit Brillantkresylblau und Nilblauchlorhydrat tief blau gefärbt. Den Befund mit Neutralrot kann ich bestätigen.

III. „Excretkörnchen", stark lichtbrechend „kristallinisch", in den Vakuolen der Rindenschicht und den benachbarten liegend, wo sie in Molekularbewegung tanzen. Er findet sie jedoch „auch in den Wänden der Vakuolen eingelagert in ähnlicher Weise wie die größeren (ersten) Körnchen" und außerdem in den Pseudopodien (S. 264). Merkwürdigerweise behauptet er, daß die „Excretkörner" mit Neutralrot nicht färbbar seien, wogegen wir sie mit Neutralrot, Brillantkresylblau, Nilblau gerade besonders lebhaft gefärbt fanden.

Wir wollen im folgenden unterscheiden als IIIa die in den Vakuolen liegenden und als IIIb die im Rindenplasma eingelagerten „Excretkörnchen". Nach meinen Erfahrungen bilden nun diese letzteren (IIIb) die große Mehrzahl der in der Rindenschicht liegenden färbbaren körnigen Plasmateile, was bei Brillantkresylblau — und auch bei Neutralrotvitalfärbung deutlich hervortritt (im Gegensatz zur Behauptung Borowsky's S. 265). Diese Körnchen nehmen, ähnlich wie die selteneren unter II genannten, diese Vitalfarbstoffe besonders gierig auf (Tafel 1, Fig. 7). Die Körnchen I, II und IIIb findet man allenthalben in Körnchenbewegung im Ectoplasma, auch auf den Strahlen, die IIIa nur in einzelnen Vakuolen.

Daß auch das Entoplasma Körner enthält, hat schon Kölliker (44) gesehen (S. 200) bei dem nahverwandten Heliozoon *Actinophrys sol*, ferner bei *Actinosphaerium* selbst Bütschli (74, 1. Bd. 1., S. 278).

IV. Färbt man lebende Actinosphärien mit Chrysoidin oder Naphthylaminrot, so bleibt die Rinde ungefärbt. Dagegen zeigen sich zahlreiche gefärbte Körnchen im Entoplasma, die wir also der obigen Liste als IV angliedern können.

V. Zuweilen weist uns Osmiumsäure einzelne schwärzbare Inhaltskörper nach, also wahrscheinlich Fett.

Dann kommen nach Borowsky die Körnchen I auch im Entoplasma vor.

Ich füge noch bei, daß die unter IIIb genannten Excretkörnchen bei ungefärbten mit Osmiumsäure fixierten Tieren häufig nicht homogen gebaut sind, sondern am Rand bald sichel-, bald ringförmig grauschwarz gefärbt sind. Ebenso sieht man oft bei Brillantkresylblauvitalfärbung gerade diesen Rand intensiv blau gefärbt. Es ist also möglich, daß diese Körner bei Bildung, Aufnahme und Transport von Fett eine Rolle spielen können.

Daß zwei Arten von vital färbbaren Körnchen im Ectoplasma von *Actinosphaerium* vorkommen, hat auch Greeff festgestellt (12, S. 13 Anmerkung). Er beschreibt eingehend seine Versuche mit Methylenblauvitalfärbung, hält aber beide Arten für „Elementarkörnchen". „Die Elementargranula treten übrigens bei einigen Sarcodinen, statt im Entoplasma, im Ectoplasma auf" . . . . . „In dieser Verteilung finden sie sich als rundliche, blasse Granula bei *Actinosphaerium eichhornii*, wo sie auf das großblasige Ectoplasma und zwar auf die peripherische, zuweilen feinvakuolär erscheinende Schicht desselben beschränkt zu sein scheinen". . . . . „In überraschender Weise gelangt dieses Verhältnis zum Ausdruck durch Färbung mit Methylenblau, da sich hierdurch sofort und meistens ganz allein das die Elementargranula enthaltende Ectoplasma mit seinen Pseudopodien färbt". . . . . Greeff färbte mit Erfolg mit Pikrokarmin nach Osmiumalkoholfixierung. „Die Elementargranula treten übrigens bei *Actinosphaerium* in zwei verschiedenen Formen auf, kleineren und größeren, die letzteren äußerst blaß und weniger zahlreich" (S. 13 unten).

Wir erkennen in der Beschreibung Greeff's unsere Körnchen I u. IIIb. Stäbchen scheint er nicht gesehen zu haben. Nur möchte ich glauben, daß nur die unter I beschriebenen Sphäroplasten sind. Daß Sphäroplasten in der Rinde vorkommen, konnte ich an Schnitten mit der Kull'schen Methode nachweisen und auch Borowsky's ziemlich eingehende Untersuchung scheint dies zu zeigen, wenn er auch den Namen nicht braucht. Leider mußte ich wegen Materialmangels meine Untersuchung hier abbrechen.

Eine schwache vitale Färbung von Sphäroplasten bei anderen Protozoen ebenfalls mit Brillantkresylblau und Neutralrot hat schon Fauré-Fremiet (80) erzielt (S. 502).

Da aber diese Färbung nicht immer eintritt, so wollen wir uns besonders den beständig mit Brillantkresylblau vital sich färbenden Bestandteilen, nämlich den unter II und ganz besonders IIIb beschriebenen zuwenden.

Hier müssen wir auch der Arbeiten von Przemycki (45—47) ge-

denken, dessen Beschreibungen aber zu kurz sind, um sie bestimmt mit denen von Borowsky und den vorliegenden in sichere Übereinstimmung zu bringen. Seine unter 1 beschriebenen scheinen den hier unter I aufgeführten zu entsprechen, seine unter 2 genannten vielleicht unseren unter IIIb. Die unter 3 beschriebenen können weder Borowsky noch ich wiederfinden.

Vitalfärbung der niedersten Tiere.

Diese Betrachtungen sollen hier Platz finden, weil ich an Hand von zahlreichen Versuchen mit *Actinosphaerium* einige Fortschritte machen konnte. Doch werden auch viele Erfahrungen mit anderen Tieren hier zugleich behandelt.

Methode.

Bekanntlich werden zur Lebendfärbung die Farbstoffe in viel größerer Verdünnung angewandt als bei der gewöhnlichen Färbetechnik. So erzielte O. Schultze (90) Färbungen mit Methylenblau bei Verdünnungen von 1 : 100 000 bis 1 : 1 000 000. Auch bei meinen früheren Versuchen bei Vitalfärbungen von Amöben war die Verdünnung hochgradig.

Diesmal benutzte ich als Stammlösung immer einprozentige Lösungen des Farbstoffes in Aqua destillata. Damit wurde nach zwei Methoden verfahren:

A. Langsame Färbung. 1 Platinöse bis 1 Tropfen Lösung auf 3—4 ccm Wasser, in dem die Tiere liegen.

Färbedauer 1—2 Stunden bis 1 Tag. Geeignet für alle Vitalfarben.

B. Schnellfärbung. Mit Platinoese wird eine damit entnommene Menge Farbe entweder direkt in den auf dem Objektträger gelegenen Tropfen gebracht, oder auf dem Deckglas ausgestrichen, mit dem man den Tropfen bedeckt. Die Färbung tritt fast augenblicklich ein. Geeignet z. B. für Brillantkresylblaugranulavitalfärbung bei *Actinosphaerium*, *Paramaecium*, zum Färben der Haut bei *Amoeba proteus* mit Methylenblau usw.

Die erwähnten Fortschritte wurden nun mit einem bisher bei den niedersten Tieren wenig gebrauchten Farbstoff, dem Brillantkresylblau, erreicht, zu dessen Empfehlung ich daher erst einige Bemerkungen vorausschicken will.

Der von Fauré-Fremiet und v. Prowazek für Protozoen angewendete Farbstoff ist in 1 % Lösung dunkelblau. Eine bakteriologische Platinöse dieser Lösung auf 3 ccm³ Wasser färbt Actinosphärien, Paramäcien und Amöben in einiger Zeit lebhaft. Die gleiche Menge Farbe auf einem Deckglas ausgestrichen, mit dem man einen auf dem Objektträger liegenden Tropfen mit Actinosphärien oder Paramäcien zudeckt, erzeugt in ganz kurzer Zeit eine dunkelblaue Vitalfärbung der Tiere. Wir haben also einen Farbstoff vor uns, den man beliebig und ohne Schaden für das Leben gewisser Tiere in schwächerer und stärkerer Lösung verwenden kann.

Nun hatte ich früher schon versucht, Vitalneutralrotfärbungen bei Paramäcien zu fixieren.

Nach Golovin (82) gelingt bei Nematoden, Amphioxus usw. die Fixierung mit Sublimat, Hober (44a) fixierte Vitalfärbungen im Darmepithel von Wirbeltieren. Das bewährte sich auch bei den Paramäcien. Jedoch wollte es auf keine Weise gelingen Dauerpräparate zu bekommen, indem der Farbstoff in Alkohol oder Glyzerin usw. regelmäßig ausgezogen wurde.

Das Verhalten des Brillantkresylblaus beim Absterben der Actinosphärien führte mich nun auf den Gedanken, daß hier möglicherweise eine festere Bindung des Farbstoffes vorliege als beim Neutralrot bei Paramaecium. Bei den meisten Vitalfarbstoffen verläßt nämlich beim Absterben der gefärbten Tiere die in den vital gefärbten Teilen angehäufte Farbe diese Gebilde und färbt alle Teile, auch den Kern, diffus, so z. B. bei vital mit Neutralrot gefärbten Amöben. Stirbt dagegen ein vital mit Brillantkresylblau gefärbtes Actinosphaerium ab, so verharrt die Farbe unverändert an den gefärbten Körnchen (bes. III b) und die erwartete diffuse Färbung tritt nicht ein.

Es lag nun nahe, auch hier einen Versuch mit der Sublimatfixierung zu machen, der auch gelang. Tagelang in Sublimat konservierte vital mit Brillantkresylblau gefärbte Actinosphaerin bewahrten treu das Bild des im Leben vorhandenen gefärbten Zustandes.

Danach wurde die Wirkung der Alkoholreihe auf die gefärbten Tiere erprobt. 70 % und 96 % Alkohol erwiesen sich als unschädlich und damit war auch die Möglichkeit gegeben Dauerpräparate in Euparal zu bekommen. Diese Präparate und ebenso ein nach gleicher Methode behandeltes Nilblauchlorhydratpräparat haben sich seit vielen Wochen unverändert erhalten (Taf. 1 Fig. 5).

Mit dieser dauerhaften Vitalfärbung wurde noch eine Kernfärbung zu vereinigen gesucht. Das Sublimat wurde durch mehrstündiges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt ohne daß sich die Färbung änderte, und nun mit Hämatoxylin oder wegen des Farbengegensatzes noch besser mit Alaunkarmin die Kerne (Taf. 1 Fig. 6) gefärbt, erneut mit Wasser mehrere Stunden gewaschen und dann nach obigem Verfahren in Euparal eingelegt.

Nun wurden Versuche angeschlossen, welche die Herstellung von Dauerpräparaten in Balsam und diejenige von Schnittpräparaten bezweckten. Carbolxylol vernichtet die Färbung. Dagegen erwiesen sich als unschädlich: Nelken- und Origanumöl, Chloroform und Benzol. Auf diesem Wege konnten Balsampräparate hergestellt werden.

Zugleich war damit auch die Möglichkeit der Einbettung erwiesen, denn daß die übrigen dabei in Betracht fallenden Umstände nichts schadeten, war entweder schon erwiesen oder bestimmt vorauszusehen. Collodium, Chloroform, Paraffin, Hitze waren alle ohne Wirkung und so gelang auch die Herstellung von Schnitten, die nun ihrerseits wieder mit Kernfarben nachbehandelt werden konnten.

Damit wären wir also im Besitz einer sicheren, auch im konservierten Zustand dauerhaften Vitalfärbung für *Actinosphaerium*.

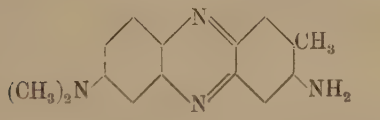
Nachträglich sah ich, daß schon PRZEMYCKI ebenfalls die Sublimatfixierung von Vitalfärbungen angewendet hat. Doch fehlt ein ausführlicherer Bericht über Methode und Ergebnisse, die wohl deshalb bisher meist unbeachtet geblieben sind. Er legte die fixierten Präparate in Glycerin ein oder bettete sie zum Zweck der Anfertigung von Schnitten nach PARKER (48) ein. Ein Verfahren für Fixierung von Bismarckbraunvitalfärbungen bei Fröschen, Kaninchen gab COLOMBO an (76).

Das Brillantkresylblau bewährte sich also auch zur Vitalfärbung anderer Protozoen. Bei *Amoeba proteus* erzielte man fast dasselbe Ergebnis wie mit Neutralrot. In *Pelomyxa* gelang die Färbung gewisser kleiner Vacuolen und der darin enthaltenen sich lebhaft bewegenden Körnchen, die GREEFF beschrieben hat. In den Amoeben der *Plasmodiophora* färbten sich die auch im ungefärbten Zustand sichtbaren Vacuolen violett und die Körnchen tief blau. In diesem Falle muß der Farbstoff die Zellwände der Pflanzenzellen durchdringen, da die Versuche an Handschnitten gemacht wurden. Daß aber auch mit sehr widerstandsfähigen Zellhäuten versehene Organismen diesen Farbstoff leicht durchlassen, zeigen

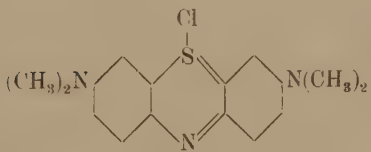
Versuche an Bierhefepilzen. Das Material verdanke ich Herrn Dr. Skraup. In den Hefezellen färben sich sehr schnell die auch im ungefärbten Zustande sichtbaren, wohlbekannten Vacuolen violett und die Körnchen tief blau (vergl. Lafar III S. 65 ff.). Paramäcien werden auch in schwacher Lösung sogleich gefärbt wie durch Neutralrot (nach Nirenstein, Prowazek und eigener Erfahrung). Wir sehen also, daß das Brillantkresylblau auch für andere niedere Tiere und Pflanzen ein sehr geeigneter Vitalfarbstoff ist. Freilich gelingt vorläufig die Weiterbehandlung zum Dauerpräparat nur bei *Actionsphaerium* besonders gut (vgl. S. 52).

Die mit dem Neutralrot so ähnliche Wirkung legte nun auch eine chemische Vergleichung der beiden Stoffe nahe, und wie die Formeln zeigen, ist auch eine gewisse Verwandtschaft vorhanden. Aber anderseits ist man erstaunt zu finden, daß das ganz völlig verschieden gebaute Bismarckbraun biologisch ganz ähnlich wirkt.

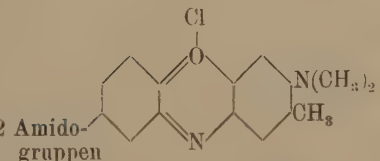
Formeln:



Neutralrot

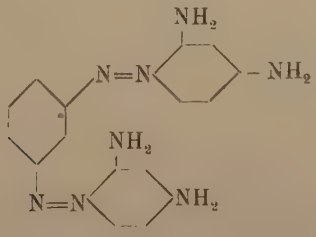


Methylenblau

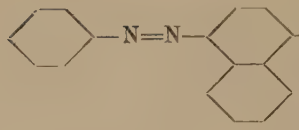


1—2 Amidogruppen

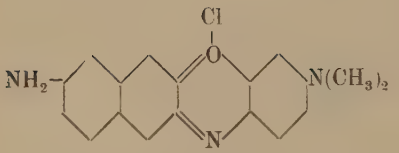
Kresylblau



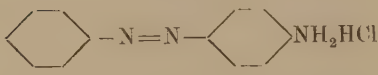
Bismarckbraun



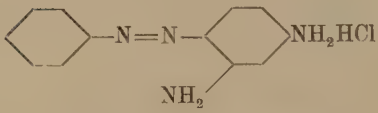
Naphthylaminrot
Benzolazo-Naphthylamin(chlorhydrat)



Nilblau



Anilingelb



Chrysoidin

Zusammensetzung der zum Fixieren verwendeten Sublimatlösung

22,5	NaCl
375,0	$HgCl_2$
3000,0 ccm	Aqua dest.

stark erwärmt, warm filtriert.

Aus zahlreichen Besprechungen und gemeinsamen Versuchen mit Herrn Dr. SKRAUP ergaben sich aus den obigen Tatsachen eine Reihe von Schlüssen, die für Technik und Theorie der Vitalfärbung von Wert sind (vgl. S. SKAUP 94, ferner HÖBER 44a).

Da nach Ansicht meines Kollegen die Bindung des Farbstoffes durch Sublimat an den NH_2 Gruppen erfolgt, so war vorauszusehen, daß die Fixierung auch bei Bismarckbraun und Nilblau möglich sein müsse. Der Versuch gelang und in beiden Fällen auch die Herstellung von Dauerpräparaten von *Actinosphaerium*.

Nun wurde zu Versuchen geschritten, wobei der Vitalfarbstoff bei sonst ähnlichem Bau nur eine NH_2 Gruppe enthielt. Da das Anilingelb nur diffus färbte, wurde Naphthylaminrot angewendet, das bei *Actinosphaerium* und Amöben Erfolg zeigte. Auch hier gelang die Fixierung mit Sublimat.

Diese einzige „Seitenkette" kann also für die Bindung an das Protoplasma kaum in Betracht fallen, da ihr Ver-

halten gegen Sublimat ihre Eigenschaften im Farbstoff unverändert zeigt. Allein die Frage, in welcher Weise die Farbstoffe eigentlich an die Plasmateile gebunden seien, soll in einer späteren Arbeit näher geprüft werden.

Hier wollen wir nur darauf hinweisen, daß es sich nicht bloß um eine Reaktion zwischen Farbe und Sublimat handeln kann, sondern daß zweifellos der Plasmateil, der die Farbe trägt, eine wichtige Rolle spielt bei der Haltbarkeit der Färbung.

Wenn man Amöben, Paramäcien und Actinosphärien mit Brillantkresylblau vital färbt, so läßt sich in allen drei Fällen die Färbung mit Sublimat fixieren. Dagegen verliert sie sich in Apathy's Gemisch und in Alkohol bei Amöben, bleibt erhalten in Apathy's Gemisch und verliert sich in Alkohol bei *Paramaecium* und bleibt erhalten in Apathy's Gemisch und in Alkohol bei *Actinosphaerium*.

Anschließend seien noch einige auffallende Farbenreaktionen bei Urtieren besprochen, die theoretisch und praktisch interessant sind.

So kann man beobachten, daß beim Versuch Amöben mit Alkaliblau zu färben, die Farbe nicht in den Zelleib eindringt, auch die Membran nicht färbt, sondern außerhalb aber dicht an der Haut in Form von Körnchen ausfällt.

Ferner beobachtet man bei *Paramaecium* beim Färben mit Neutralrot oder Brillantkresylblau sehr oft neben der Färbung von Plasmateilen einige gefärbte Kugeln außerhalb an den Enden des Tieres, die auch in den Dauerpräparaten in Apathy's Gemisch erhalten bleiben. Prowazek (70) scheint ähnliche Vorgänge gesehen zu haben.

Auf die vitale Färbung der Haut von Amöben mit Methylenblau wurde schon früher hingewiesen.

Auch bei *Volvox* gibt Methylenblau sehr lehrreiche Bilder. Diese Methode wurde mir von Herrn Prof. Baltzer vom zoologischen Institut gütigst mitgeteilt. Bringt man Tiere in ziemlich tiefblaue Methylenblaulösung, so färben sich in kurzer Zeit die Cuticulaleisten und bilden in der Aufsicht ein regelmäßiges Netz aus aneinanderstoßenden Vielecken, deren jedes in der Mitte die *Volvox*-Zelle zeigt. (Näheres über Cuticula von *Volvox* bei Janet (68) S. 34 ff.). Diese Cuticulafärbung ist mit Sublimat konservierbar, wobei die Farbe in Rot umschlägt und hält sich darin viele Wochen. 70% Alkohol hat keine Wirkung, dagegen tritt in 96% Alkohol rasche

Entfärbung ein. Diese Färbung läßt sich übrigens auch an konserviertem, vorher ungefärbtem Material hervorrufen, z. B. nach Formolfixierung.

Überblicken wir die eben genannten Fälle, so können wir sie vorläufig in eine Reihe ordnen in folgendem Sinne:

Das Auftreten gefärbter Körner außen an der Haut bei mangelnder Färbung im Innern könnte vielleicht erklärt werden durch eine Wirkung des Tieres auf seine nächste Umgebung. Ebenso verhält es sich vielleicht bei *Paramaecium*. Wir könnten vorläufig solche Erscheinungen Außenfärbung nennen. Daran anschließend setzen wir die Membranfärbungen (Cuticula bei *Volvox*, Haut bei Amöben, beides mit Methylenblau). Erst dann gelangen wir zu den eigentlichen typischen Vitalfärbungen, die man als Innenfärbungen an die vorigen anschließen könnte.

Prowazek äußert sich in dem Sinne, daß die Farbe bei *Paramaecium* nicht nur durch die Mundöffnung, sondern auch durch die Haut hindurch eindringen könne.

Folgende Beobachtung liefert den Beweis, daß dies sogar der einzige Weg sein kann. Färbt man Paramäcien in Conjugation mit Neutralrot oder Brillantkresylblau vital, so dringt in diese conjugierenden Tiere der Farbstoff ebenso rasch ein wie in die nicht conjugierenden. Bei den conjugierenden sind aber bekanntlich die Mundöffnungen verklebt und nicht funktionsfähig. Also bleibt nur der Weg durch die Haut übrig.

Zum Schluß noch eine Betrachtung über den Wert der Vitalfärbungsmethode.

Wir haben im Vorhergehenden eine große Anzahl von Tatsachen zusammengetragen, welche zeigen, wie mannigfaltig die Ergebnisse der Lebendfärbung sein können. Zwar scheint die Färbung gewisser Teile den Tieren zu schaden, z. B. die „vitale" Kernfärbung, so daß sie bald absterben. Ich halte auf Grund eigener Erfahrungen mit Brillantkresylblau mit Fischel (81) eine vitale Färbung gesunder Kerne für noch nicht erwiesen. Doch scheint es mir nicht unmöglich, daß wir einmal dieses Ziel erreichen, wenn sich die Angaben von Przemicky bestätigen sollten (Przemicky C). Dagegen scheint nun das Plasma Vitalfarbstoffe in sozusagen alle Bestandteile mehr oder weniger leicht aufnehmen zu können.

Nehmen wir als Beispiel die Amöben. Der gewöhnliche Gang ist (z. B. für Neutralrot) der, daß sich zuerst die Nahrungsvakuolen mit ihrem Inhalt färben, darauf die Eiweißkugeln, die kleinsten

Körner, die an den Nahrungsvakuolen und im Plasma zerstreut liegen. — dazu haben wir gesehen, daß eine vitale Färbung der Haut möglich ist, und wissen aus den Mitteilungen von Brandt und Schürmayer, daß auch die kontraktile Vakuole sich färben läßt, — allerdings offenbar nur mit Schädigung des Lebens. — überdies sieht man häufig diffuse Färbungen des ganzen Plasmas, — so daß man sich wirklich fragen muß: „Gibt es im Plasma der Protozoen überhaupt etwas, das nicht vital gefärbt werden könnte?"

Die Vielseitigkeit der Methode empfiehlt sie also in hervorragendem Maße für Plasmastudien überhaupt (vgl. auch Grosse (15) S. 230). Selbstverständlich muß sie mit Kritik ausgeübt werden, um Trugbilder zu vermeiden. Der stetige Vergleich mit dem ungefärbten lebenden Tier, die fortwährende Kontrolle während der Färbung, die Beobachtung der Erscheinungen beim Absterben und Fixieren, Vergleichung mit Dauerganz- und Schnittpräparaten, sichern den Weg und lassen die Methode als ein überaus wertvolles, ja vielleicht unentbehrliches Hilfsmittel auf unserem Gebiete erscheinen.

Ihr Wert wird noch gesteigert durch die Möglichkeit, die im allgemeinen vergänglichen Bilder festzuhalten und aufzubewahren, da dann auch eine nachträgliche Vergleichung und Kombination mit den sonst üblichen Verfahren möglich wird, wie wir es bei *Actinosphaerium* gezeigt haben.

Bekanntlich lassen sich bei Wirbeltieren auch die Goldmann-schen Lebendfärbungen und zwar mit Formol fixieren und mit der Gefrierschnittmethode weiter verarbeiten, was ich an Fröschen zusammen mit Herrn cand. med. Hellmann nachuntersucht habe. Es gelang aber in der Regel nicht, die gefärbten Stücke ohne Schädigung zum Zweck der Paraffineinbettung weiter zu behandeln. Günstiger liegen die Verhältnisse offenbar bei gewissen Nervenfärbungen mit Methylenblau und bei Vitalfärbung mit Lithionkarmin. Doch eignen sich leider weder die Goldmann'schen Farbstoffe noch Lithionkarmin für die Färbung von Protozoen, wie ich durch zahlreiche Versuche feststellen konnte.

4. Der Bau des Plasmas von *Aethalium septicum*.

a) Material.

Das Material stammte zum Teil aus dem Freien, wo *Aethalium* auf faulendem Holz, Moos usw. vorkommt und wurde uns von unserem hochverehrten Vorgesetzten Herrn Prof. Dr. O. Schultze

und Herrn Forstinspektor Niehus übergeben. Dazu erhielt ich Lohblüte aus der Gerberei des Herrn Eichhorn in Marktbreit, der mir in zuvorkommender Weise Plasmodien und Fruchtkörper zur Verfügung stellte. Allen den genannten Herren sage ich meinen besten Dank.

Schwärmer und Amöben waren, nachdem die Aussaat in reinem Wasser nicht hatte gelingen wollen, leicht in Lohewasser im hängenden Tropfen zu erhalten. Nach einer Abwesenheit von 8 Monaten fand ich in einer gedeckten Schale mit feuchter Lohe, worin ich vorher reichlich Sporen gesät hatte, eine Anzahl Plasmodien in Form von Strängen, Netzen und Platten.

b) Untersuchung.

Der Kreislauf der Entwicklung von *Aethalium* verläuft bekanntlich so, daß aus den mit einer deutlichen Schale versehenen Sporen bewegliche, geißeltragende Schwärmer hervorgehen, die nach Verlust der Geißel zu Myxamöben werden, die wieder durch Zusammentreten in immer größerer Zahl in Plasmodien sich verwandeln, aus denen dann die Fruchtkörper mit den Sporen hervorgehen.

Es fragt sich nun, wie bei diesen mannigfach verschiedenen Formen, wobei sich an den Kernen wichtige Vorgänge abspielen (Jahn, Prowazek usw.), das Plasma sich verhält, namentlich auch, ob die Sphäroplasten sich immer nachweisen lassen.

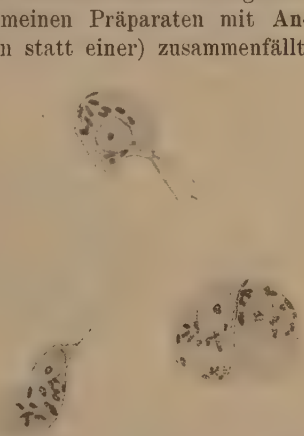
Textfig. L. Sporen von *Aethalium septicum*.

Wir beginnen mit den Sporen. Schon die Beobachtung frischer Sporen überzeugt uns, daß ihr Plasma nicht homogen ist. Nach Behandlung mit Osmiumsäure unterscheiden wir deutlicher den im Leben nur schwer sichtbaren Kern und eine Anzahl von Körnchen (Textfig. L), die wir an Schnitten nach Kull, Schultze und Heidenhain als Sphäroplasten erkennen (Fig. 8 auf Taf. 1).

Die lebenden Schwärmer sind meist schwer auf feinere Einzelheiten ihres Plasmas zu untersuchen, da sie fortwährend in ruckweiser Hin- und Herbewegung sich befinden und selten einmal kurze Zeit stille liegen. In solchen Augenblicken kann man einen körnigen Bau des Plasmas wahrnehmen. Über die Natur dieser schwer färbbaren Körner gibt uns die Nachbehandlung Aufschluß. Die Kulturen werden über der Flamme getrocknet und dann in Blockschälchen auf die Fixierungsflüssigkeit (Osmiumsäure 2 %, Osmium-

bichromat, Kalibichromatformol, Zenker usw.) gelegt und weiter behandelt, z. B. mit gutem Erfolg nach Heidenhain. Die Körner bleiben bei Osmiumbehandlung erhalten und lassen sich mit Eisenhämatoxylin färben. Also haben wir offenbar Sphäroplasten vor uns. In manchen Schwärmern sind sie deutlich stäbchenförmig.

Nach Lister (60, S. 8) und anderen wissen wir, daß die Schwärmer sich wiederholt teilen. Da nun der stäbchenförmige Zustand der Sphäroplasten überdies in meinen Präparaten mit Anzeichen von Teilung (z. B. zwei Geißeln statt einer) zusammenfällt, so scheint diese auffallende Formveränderung auf eine Teilung der Sphäroplasten hinzudeuten (Textfig. N, S. 64c). (Nach Jahn (56, S. 89) fällt die Entstehung der zwei Geißeln bei gewissen Myxomycetenschwärmern ziemlich genau mit den ersten Vorbereitungen zur Zellteilung zusammen.) Fauré-Fremiet hat nachgewiesen, daß Sphäroplasten sich teilen können. — Es ist bemerkenswert, daß hier alle Sphäroplasten im gleichen Individuum gleiche Form zeigen, was gut übereinstimmt mit Fauré-Fremiet's Satz, daß alle Mitochondrien einer Zelle gleichzeitig in Teilung treten. Auch mit bestimmten Stadien der Kernteilung soll nach ihm Gleichzeitigkeit bestehen. Manche dieser Stäbchen scheinen in der Mitte etwas eingeschnürt.



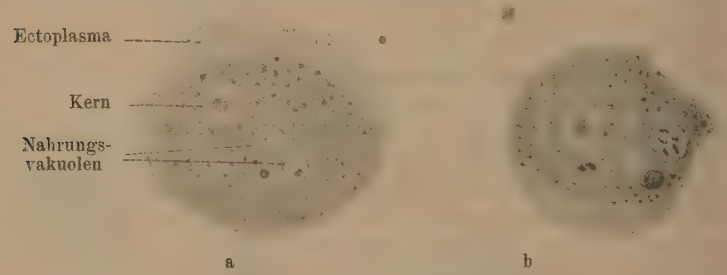
Textfig. N. Schwärmer von *Aethalium*. Osmiumsäure. Heidenhain. Stäbchenförmige Sphäroplasten.

Sehr auffallend war mir auch, daß anscheinend die Zahl der Sphäroplasten in einer großen Zahl von Schwärmern übereinstimmte. Ich stieß immer wieder auf ungefähr 14 in einem Schwärmer, ohne indes mit aller Sicherheit behaupten zu können, daß diese Zahl immer genau stimmte, weil sich die Sphäroplasten im Ausstrich teilweise gegenseitig überdecken können. Aber der dringende Verdacht, daß ihre Anzahl in den Schwärmern und damit höchstwahrscheinlich auch in den Sporen eine ganz bestimmte sei, war nicht von der Hand zu weisen. In einer an die vorliegende anschließenden Arbeit werden wir überraschende Beispiele für die Richtigkeit dieser Vermutung kennen lernen.

Daraus würde sich nun die weitere Frage erheben, ob dieser

Zusammenhang ein notwendiger ist, d. h. ob sich die Sphäroplasten bei jeder Kernteilung ebenfalls teilen müssen oder ob die beiden Vorgänge nur unter gewissen Umständen zugleich verlaufen. Es müßte also geprüft werden, ob z. B. bei den im Plasmodium stattfindenden Kernteilungen sich die Sphäroplasten auch teilen. Vorläufig muß ich leider wegen Mangels an geeignetem Material auf die Untersuchung dieser Frage verzichten.

Leichter als bei den Schwärmern ist der Bau der Amöben im Leben zu sehen (Textfig. M). Sie enthalten außer dem Kern, der kontraktilen Blase und Nahrungsvakuolen hyalines Außen- und



Textfig. M. Amöben von *Aethalium*.

körniges Innenplasma. Die kontraktile Vakuole wächst in etwa einer Minute zur maximalen Füllung, entleert sich und verschwindet, um nach 10 bis 30 Sekunden wieder zu erscheinen. Die Körner bleiben bei Osmiumfixierung erhalten und sind nach HEIDENHAIN färbbar. Ihre Zahl scheint bedeutend größer als bei den Schwärmern.

Am Plasmodium können wir ebenfalls schon im Leben das sehr stark gekörnte Plasma feststellen. Aber oft sehen wir dort in erster Linie die wahrscheinlich mit den Sphäroplasten verwandten, aber doch von ihnen verschiedenen gelben, kalkführenden und etwas (vgl. DE BARY (50) a. S. 43) größeren Körner, währenddem die Sphäroplasten eher die tieferen Schichten einnehmen. Dort kann man sie aber mit den entsprechenden Methoden leicht darstellen (Taf. 1, Fig. 8). In einzelnen Plasmodien zeigte sich auf den Schnitten eine auffallend dichte Anordnung von Sphäroplasten an der Oberfläche. Wahrscheinlich gehen sie dort in die gelben Körner über. Leider fehlen aber vorläufig noch die Stadien, welche mit voller Sicherheit diesen Übergang zeigen.

Jedenfalls haben wir aber Sphäroplasten in allen Gliedern des Entwicklungskreises nachweisen können.

5. Der Bau des Plasmas von *Plasmodiophora brassicae*.

Das Material zur Untersuchung erhielt ich von Herrn Gärtner Kaiser in Würzburg und aus dem Garten des Kantonspitals in St. Gallen.

Ich untersuchte es zunächst in physiologischer Lösung an Handschnitten. Die Amöben zeigen ein deutlich vakuolisiertes und zwischen den Vakuolen gekörntes Plasma. Oft schickt es feine Ausläufer gegen die Zellwand und die Ausläufer tragen häufig unterwegs und besonders am Ansatz an die Zellwand Anschwellungen. Die Körnchen scheinen zu zwei verschiedenen Arten zu gehören: 1. größere, grünliche; 2. kleinere, blasse.

Zur besseren Sichtbarmachung dieser Einzelheiten bedienen wir uns mit Vorteil der Vitalfärbung mit Brillantkresylblau. Dieser Farbstoff färbt die Vakuolen violett und die größeren Körner tief blau.

Prowazek (65) (S. 397) äußert sich sehr unbestimmt über den vakuolären Bau des Protoplasmas. Durch die Beobachtung am Lebenden, ungefärbt und mit Vitalfärbung, haben wir uns überzeugt, daß der stark alveoläre Bau, den wir an fixierten Präparaten finden, ein wirklich im Leben vorhandener Zustand ist.

Fixieren wir nun das frische Präparat mit Osmiumsäure, so finden wir, daß einzelne Alveolen sich grünlich-schwarz färben, also offenbar Fett enthalten. Andere bleiben farblos. (Über Fett in den Amöben siehe auch Nawaschin (64) S. 412.)

Fertigen wir endlich Schnitte von solchem Osmiummaterial an und behandeln sie nach Kull oder nach Heidenhain, so können wir damit das Vorhandensein zahlreicher, punktförmiger, in den Strängen des Plasmanetzes sitzender Mitochondrien oder Sphäroplasten feststellen. Zugleich färben sich auch die Mitochondrien der Wirtszelle. Diese scheinen durchwegs stabförmig zu sein (Taf. 1, Fig. 9).

Die Sphäroplasten, die offenbar den unter 2 genannten Körnchen des lebenden Protoplasmas entsprechen, sind wahrscheinlich schon von Nawaschin (64) an Schnitten gesehen und gefärbt worden, allerdings ohne daß ihre Zugehörigkeit zu den Mitochondrien erkannt wurde. Seine Figuren 16 und 18 geben Bilder, die ähnlichen Plasmabau zeigen wie meine Präparate.

Schlußbetrachtungen.

Wenn wir zum Schluß das ganze große Material überblicken, das angefangen mit den mehr vereinzelten Angaben von Benda (73)

(*Balantidium*), Zoja (*Amoeba limax*), Hirschler (84) (*Monocystis*) und, ganz besonders aber durch die Arbeit von Fauré-Fremiet (80), dazu mit dem vorliegenden, zusammengetragen wurde, so muß man zugeben, daß die Sphäroplasten bei den Protisten allgemein verbreitet sind und offenbar eine wichtige Rolle im Aufbau des Plasmas spielen.

Da sie zugleich das einzige gemeinsame bilden, das im Plasma der niedersten Tiere vorkommt, so liegt es nahe sie auch für einen ursprünglich vorhandenen Teil zu betrachten und die übrigen Plasmainhaltskörper für erst im weiteren Lauf der Entwicklung erworben (Eiweißkugeln, Kristalle, „Excretkörnchen"), die darum auch in gewissen Zuständen fehlen können (z. B. Eiweißkugeln und Kristalle der Amöben nach Prandtl (25)), während nach allem was wir wissen, die Sphäroplasten im lebenden Plasma unserer Tiere immer vorhanden sind.

Beim Vergleich mit den offenbar nahe mit ihnen verwandten Mitochondrien der Metazoen fällt die Säureunempfindlichkeit der Sphäroplasten (Fauré, Vonwiller) gegenüber der Säureempfindlichkeit der Mitochondrien (z. B. O. Schultze (91) 1915 S. 84) auf, ferner das Vorwiegen der Körnerform und die Seltenheit der Stäbchenform. Nach Fauré-Fremiet sollen sie sich teilen können. Über die Funktion haben wir nur Vermutungen.

Die Wabentheorie gibt keine erschöpfende Erklärung für den Bau des Plasmas der niedersten Tiere. Um zu einer solchen zu gelangen, muß die Sphäroplasten-Mitochondrienlehre im weitgehendsten Maße herangezogen werden.

Die vitale Färbung ist eine unentbehrliche Methode zur Erforschung des Plasmas der niedersten Tiere.

V. Vorarbeiten für eine Protozoenfauna von Würzburg und Umgebung.

(Nach Angaben von Prof. Dr. O. Schultze. Prof. Dr. F. Baltzer, Institutsdiener Engelbrecht, caud. phil. Zillig, Inspektor Niehus, Dr. Vonwiller.)

I. Rhizopoden.

Amoeba proteus. Aquarien des zoolog. Instituts (Baltzer, Vonwiller).

Amoeba nobilis, ibidem (Vonwiller).

Andere nicht näher bestimmte Amöben: Anlagen in der Nähe des anatomischen Instituts, Main unterhalb der untersten Brücke (Vonwiller).

Pelomyxa palustris. Teich im Garten des zoolog. Instituts (Vonwiller) vereinzelt auffallend große Exemplare neben vielen kleineren, VI. und VII. 1916).

Ia. Heliozoen.

Actinosphaerium eichhorni. Teich im Garten des zoolog. Instituts (Baltzer, Engelbrecht, Vonwiller). Maintümpel bei Zell (Vonwiller).

Ib. Mycetozoen.

Aethalium septicum. Brückenau (Prof. Schultze), Ochsenfurterwald (Inspektor Niehus). Marktbreit, Gerberei Eichhorn (Vonwiller). Guttenbergerwald (Vonwiller).

Plasmodiophora brassicae. Würzburg (Vonwiller).

Lycogala epidendron. Guttenbergerwald, Zellerwald (Vonwiller).

Arcyria denudata „ „

Trichia persimilis „ „

II. Ciliaten.

Paramaecium Stilonychia, überall sehr verbreitet.

Frontonia leucas. Maintümpel bei Zell (Vonwiller), Garten des zoolog. Instituts (Baltzer, Vonwiller).

Stentor coeruleus. Maintümpel bei Zell (Vonwiller).

Stentor roeseli, zwischen Schweinfurt und Mainberg (Vonwiller)

Spirostomum spec. Maintümpel bei Zell (Vonwiller).

Trichodina auf Hydra. Aquarien des zoolog. Instituts (Baltzer Vonwiller).

Prorodon spec. Main (Vonwiller).

Carchesium polypinum, Alandsquelle (Baltzer, Engelbrecht).

Epistylis spec. Main, Schloßpark Veitshöchheim (Vonwiller).

III. Flagellaten.

Volvox globator. Steinberg (Leidyg (72) Horae zoologicae), Tümpel an der Straße Höchberg—Waldbüttelbrunn, etwa 1 km vor Waldbüttelbrunn (Vonwiller, Baltzer).

Tümpel an der Straße Unterdürrbach—Oberdürrbach (Vonwiller). Schwemmsee (Baltzer, Engelbrecht). Lochweg bei Kitzingen (Engelbrecht).

Euglena viridis, Wallgraben (Zillig).

Eine rotgefärbte *Euglena* spec. im oben genannten Tümpel bei Waldbüttelbrunn (Vonwiller).

Euglena spec. (grün), Rotkreuzhof (Vonwiller).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung meines hochverehrten Vorgesetzten und Lehrers Herrn Prof. Dr. O. Schultze ausgeführt, dem ich für Anregung, Rat und wohlwollende Unterstützung jeder Art herzlich danke.

Literaturverzeichnis.

I. Amöben.

1) Arndt, A.: Über generative Vorgänge bei Amoeba chondrophora n. spec. Arch. f. Protistenk. Bd. 34 S. 39—59 1914.

2) Auerbach, L.: Über die Einzelligkeit der Amöben. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 7 S. 365—430 1856.

3) Awerinzew, S.: Beiträge zur Struktur des Protoplasmas und des Kernes von Amoeba proteus (Pall.). Zool. Anz. Bd. 32 S. 45—51 1908.

4) —: Beiträge zur Kenntnis der Süßwasserrhizopoden. Arch. f. Protistenk. Bd. 8 S. 112 1907.

5) Brandt, K.: Färbung lebender einzelliger Organismen. Biol. Zentralbl. Bd. 1 1882.

6) Chatton, E. und Brodsky, A.: Le parasitisme d'une Chytridinée du genre Sphaerita Dangeard chez l'Amoeba limax Dujard. Étude comparative. Arch. f. Protistenk. Bd. 17 S. 1—18 1909.

7) Carter, Lucy, A.: Note on a case of mitotic division in Amoeba proteus Pall. Proc. of the Royal Phys. Soc. of Edinburgh Bd. 29 1913.

8) Doflein, F., Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. V. Amöbenstudien. Arch. f. Protistenk. Suppl. I S. 250—293 1907.

9) Greeff, R., Über einige in der Erde lebende Amöben und andere Rhizopoden. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 2 S. 299—331 1866.

10) —: Studien über Protozoen. Marburger Sitz.-Ber. S. 136 1888.

11) —: Über den Organismus der Amöben. Sitz.-Ber. d. Ges. z. Beförd. d. ges. Naturwiss. Marburg S. 21—25 1890.

12) —: Über Erdamöben. Ibid. S. 1—26 1891.

13) —: Über den Organismus der Amöben. Biol. Zentralbl. Bd. 11 S. 599—608 1891.

14) —: Über Amöben. Biol. Zentralbl. Bd. 12 S. 373—384 1892.
—: Über Amöben. III. Mitteilung. Sitz.-Ber. Marburg S. 22—43 1892.

15) Grosse-Allermann: Studien über Amoeba terricola, Greeff. Arch. f. Protistenk. Bd. 17 1909.

16) Gruber: Studien über Amöben. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 41 S. 219 1885.

17) —: Über einige Rhizopoden aus dem Genueserhafen. Ber. d. naturf. Ges. zu Freiburg i. Br. Bd. 4 S. 35.

18) Hofer, B.: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Kerns auf das Protoplasma. Jenaische Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24 S. 105—176 1890.
19) Metcalf: Studies upon Amoeba.
20) —: The life-cycle in Amoeba. The Journal of experim. Zool. Bd. 9 1910.
21) Nägler, K.: Fakultativ parasitische Micrococcen in Amöben. Arch. f. Protistenk. Bd. 19 S. 246—254 1910.
22) Penard, E.: Observations sur les Amibes à pellicule. Arch. f. Protistenk. Bd. 6 S. 175—206 1905.
23) —: Nouvelles recherches sur les Amibes du groupe Terricola. Arch. f. Protistenk. Bd. 28 S. 78—140 1912.
Pascher: Studien über die rhizopodiale Entwicklung der Flagellaten 1 und 2. Arch. f. Protistenk. Bd. 36 S. 81—136.
24) Prandtl: Der Entwicklungskreis von Allogromia. Arch. f. Protistenk. Bd. 9 1907.
25) —: Die physiologische Degeneration der Amoeba proteus. Arch. f. Protistenk. Bd. 8 S. 281 1907.
26) Prowazek: Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 63 1897.
27) Schubotz: Beiträge zur Kenntnis der Amoeba blattae (Bütschli) und Amoeba proteus (Pallas). Arch. f. Protistenk. Bd. 6 1905.
28) Stolc: Über das Verhalten des Neutralrots im lebendigen Protoplasma. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 1 1902.
28a) Unna u. Tieleмann, Zur Chemie der Amoeben. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. I. Abt. Bd. 80 S. 66—89 1918.
29) Vonwiller, P.: Über den Bau der Amöben. Arch. f. Protistenk. Bd. 28 1913.
—: Die Sphäroplasten von Amoeba proteus. (Vorläufige Mitteilung.) Anat. Anz. Bd. 48 S. 485—488 1915.
30) v. Wasielewski, Th. und Kühn, A.: Untersuchungen über Bau und Teilung des Amöbenkernes. Zool. Jahrb. Bd. 38 S. 253—326 1914.
31) Zoja, L. u. R.: Intorno ai plastiduli fucsinofili. Memorie del reale istituto lombardo di scienze e lettere Bd. 16 1891.

II. Pelomyxa.

32) Blochmann, F.: Kleine Mitteilungen über Protozoen. Biol. Zentralbl. Bd. 14 S. 82—95 1894.
33) Bott, K.: Über die Fortpflanzung von Pelomyxa palustris. Arch. f. Protistenk. Bd. 8 S. 120 1907.
34) Greeff, R.,: Pelomyxa palustris, ein amöbenartiger Organismus des süßen Wassers. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 10 1874.
35) Gould, Lilian, J.: Notes on the minute structure of Pelomyxa palustris Greeff. A Journal of Micr. Sc. Bd. 36 S. 295—506 1893.
36) Korotneff: Etudes sur les rhizopodes. Arch. de zool. exp. et générale Bd. 8 1879.
37) Tönniges, C.: Die Fortpflanzung von Pelomyxa palustris. Sitz.-Ber. d. Ges. zur Bef. d. ges. Naturw. zu Marburg. Jahrg. 1909 S. 37—43 1910.

III. Actinosphaerium.

38) Borowski, W. M.: Untersuchungen über Actinosphaerium eichhorni. Arch. f. Protistenk. Bd. 10 S. 255- 288 1910.

39) Brandt, K.: Über Actinosphaerium eichhorni. Diss. Halle a. S. 1877.
40) Claparède: Über Actinophrys eichhorni. Arch. f. Anat. u. Phys. 1854.
41) Doflein, F.: Studien zur Naturgeschichte der Protozoen VII. Untersuchungen über das Protoplasma und die Pseudopodien der Rhizopoden. Zool. Jahrb. Bd. 39 S. 334—384 1916.
42) Greeff, R.: Über Actinophrys eichhorni und einen neuen Süßwasserrhizopoden, insbesondere in Rücksicht auf Teilbarkeit derselben resp. Vermehrung durch künstliche Teilung. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 3 S. 396—403 1867.
43) Hertwig, R.: Über Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium eichhorni. Abhandl. d. Math.-phys. Klasse d. kgl. bayr. Akad. d. Wissensch. München Bd. 19 1899.
44) Kölliker, A.: Das Sonnentierchen, Actinophrys sol. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 1 S. 198—217 1849.
44a) Höber, R.: Über Resorption im Darm. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 86 S. 199—214 1901.
45) Przemicky, A. M.: Über intravitale Färbung des Kernes und des Protoplasmas. Biolog. Zentralbl. Bd. 17 S. 321—335 u. 353—364 1897.
46) —: Über die intravitale Färbung des Zellkerns. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morph. u. Phys. in München. Bd. 15 S. 70—74 1899/1900.
47) Über Zellkörnchen bei den Protozoen. Biolog. Zentralbl. Bd. 14 S. 620—626 1894.
48) Parker, G. H.: A method for making paraffine sections from preparations stained with Ehrlich's Methylenblau. Zool. Anz. S. 375—377 1892.
49) Schultze, M.: Das Protoplasma der Rhizopoden und der Pflanzenzellen. Ein Beitrag zur Theorie der Zelle. Leipzig 1863.

IV. Aethalium septicum.

50) de Bary: Die Mycetozoen (Schleimpilze). Ein Beitrag zur Kenntnis der niedersten Organismen. 2. umgearb. Aufl. 6. Taf. Leipzig 1864.
51) —: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. Leipzig 1884.
52) Cienkowsky: Zur Entwicklungsgeschichte der Myxomyceten. Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 3 S. 325—337 1863.
53) —: Das Plasmodium. Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 3 S. 400—441 1863.
54) Harper, R. A.: Cell and nuclear division in Fuligo varians. Botanical Gazette Bd. 30 Nr. 4 S. 217—251 1900.
55) Jahn, E.: Der Stand unserer Kenntnisse über die Schleimpilze. Naturwiss. Rundschau 14. Jahrg. Nr. 42 S. 529—532 1899.
56) —: Myxomycetenstudien. Kernteilung und Geißelbildung bei den Schwärmern von Stemonitis flaccida Lister. Verh. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 22 S. 84—92 1904.
57) —: Myxomycetenstudien. Die Keimung der Sporen. Ibid. Bd. 23 S. 489—497 1905.
58) —: Myxomycetenstudien. Kernverschmelzungen und Reduktionsteilungen. Ibid. Bd. 25 S. 23—26 1907.
59) Lister, A.: On the cultivation of Mycetozoa from spores. Journal of Botany Bd. 39 S. 5—8 1901.
60) —: A monograph of the Mycetozoa. 2. Aufl. London 1911.

61) Prowazek, J.: Kernveränderungen in Myxomycetenplasmodien. Österr. botan. Zeitschr. Jahrg. 1904 S. 278—281.
62) Zopf, W.: Die Pilztiere oder Schleimpilze. Breslau 1885.

V. Plasmodiophora.

63) Maire R. und Tison A.: La cytologie des Plasmodiophoracées et la classe des Phytomyximae. Annales mycologici Bd. 7 S. 226—253 1909.
64) Nawaschin: Beobachtungen über den feineren Bau und Umwandlungen von Plasmodiophora brassicae Wor. im Laufe ihres intracellulären Lebens. Flora Bd. 96 S. 404—427 1899.
65) Prowazek: Über den Erreger der Kohlhernie, Plasmodiophora brassicae und die Einschlüsse in den Carcinomzellen. Arb. a. d. k. Gesundheitsamte Berlin Bd. 22 S. 396 1905.
66) Sorauer: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. 3. Aufl. Bd. 2 S. 6—12 1908.
67) Woronin: Plasmodiophora brassicae, Urheber der Kohlpflanzenhernie. Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 11 S. 548—574 1878.

Andere Protozoen.

68) Janet, Ch.: Le Volvox. Limoges 151 S. 1912.
69) Nirenstein, E.: Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 5 1905.
70) Prowazek: Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 63 1897.

Hefe.

71) Will, H.: Anatomie der Hefezelle in Handbuch der technischen Mycologie von Fr. Lafar. Bd. 4 1905—1907.

Fauna.

72) Leidyg, Fr.: Horae zoologicae. Jena 1902.

Allgemeines.

73) Benda: Weitere Beobachtungen über die Mitochondria und ihr Verhältnis zu Secretgranulationen, nebst kritischen Bemerkungen. Verh. d. Phys. Ges. Berlin 1899.
74) Bütschli, O.: Protozoen in Bronn: Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Bd. 1 Sarkodina und Sporozoa 1880—82.
75) —: Untersuchungen über mikroskopische Schäume und das Protoplasma. Leipzig 1892.
76) Colombo, G.: Di un methodo per tingere „intra-vitam" i granuli protoplasmatici degli elementi cellulari della cornea e per fissare la colorazione ottenuta. Zeitschr. f. wiss. Mikr. Bd. 20 S. 282—288 1903.
77) Doflein: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena 1911.
78) Darwin, Ch.: Die Entstehung der Arten durch natürliche Zuchtwahl. Deutsch nach der letzten englischen Ausgabe von Georg Gärtner. Halle a. S.
79) Duesberg: Plastosomen, Apparato reticolare interno und Chromidialapparat, Merkel-Bonnet Bd. 20 1912.
80) Fauré-Fremiet: Etude sur les mitochondries des protozoaires et des cellules sexuelles. Archives d'anatomie microscopique. Literatur! Bd. 11 S. 457—648 1909/1910.

81) FISCHEL: Vitale Färbung. Encyclop. d. mikr. Technik Bd. 2 S. 589—602 1910.
— : Untersuchungen über vitale Färbung. Anatom. Hefte 1. Abt. LII./LIII. Bd. 16 1901.
82) GOLOVIN, E.: Sur le fixage du Neutralrot. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. 19 S. 176—185 1902.
83) GUILLERMOND, A.: Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastes des végétaux. Arch. d'anat. micr. Bd. 14 S. 309—428 1912/1913.
84) HIRSCHLER, J.: Über Plasmastrukturen (GOLGI'scher Apparat, Mitochondrien u. a.) in den Tunicaten-, Spongien- und Protozoenzellen. Anatom. Anz. Bd. 47 S. 289—311.
85) KÖLSCH: Untersuchungen über die Zerfließungserscheinungen der ciliaten Infusorien (nebst Bemerkungen über Protoplasmastruktur, Protoplasmabewegung und Vitalfärbungen). Zoolog. Jahrb. Bd. 16 Abt. f. Anat. u. Ontog. 1902.
86) KULL, HARRY: Eine Modifikation der ALTMANN'schen Methode zum Färben der Chondriosomen. Anatom. Anz. Bd. 45 S. 153—157 1914.
87) MICHAELIS: Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 55 S. 558—575 1900.
88) NIRENSTEIN: Das Wesen der Vitalfärbung. 85. Vers. deutsch. Naturforsch. u. Ärzte 2. T. 2. Hälfte S. 8—18, Wien 1913.
89) PRENANT, BOUIN, MAILLART: Traité d'Histologie. Paris, Masson.
90) SCHULTZE, M.: Das Protoplasma der Rhizopoden und der Pflanzenzellen. Ein Beitrag zur Theorie der Zelle 68 S. Leipzig 1863.
91) SCHULTZE, O.: Die vitale Methylenblaureaktion der Zellgranula. Anat. Anz. Bd. 2 S. 684—688 1887.
— : Altes und Neues über den Bau und die formative Tätigkeit des Protoplasmas. Sitz.-Ber. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg Nr. 6 S. 81—94 1915.
92) — : Über die Anwendung der Osmiumsäure und eine neue Osmiumhämatoxylinmethode. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie u. f. mikroskop. Technik Bd. 27 S. 465—475 1910.
93) SCHÜRMAYER, C. B: Über den Einfluß äußerer Agentien auf einzellige Wesen. Jenaische Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24 1890.
94) SKRAUP, S.: Über Vitalfärbung mit einfachsten Farbstoffen und ihre Fixierung. Ber. d. deutsch. chem. Ges. Jahrg. 59 S. 2142—54 1916.
95) PASCHER: Studien über die rhizopodiale Entwicklung der Flagellaten. Arch. f. Protistenk. Bd. 36 S. 31—136 1915.

Tafelerklärung.

Tafel 1.

Fig. 1. *Amoeba terricola*. Zu sehen: Kern, kontraktile Vakuole, Nahrungsballen, Plasma erfüllt von vital gefärbten Kügelchen. Vitale Neutralrotfärbung. LEITZ Oc. I Obj. 5 ABBÉ.

Fig. 2. *Amoeba proteus*. Kern, Eiweißkugeln, Hämatoxylin. Ganzpräparat.

Fig. 3. *Amoeba proteus.* a) Kern, b) Eiweißkugeln (blau), c) Sphäroplasten (gelbrot). Leitz Oc. III Obj. 7 Abbé. Kull's Mitochondrienfärbung.

Fig. 4. *Aethalium septicum.* Sporen. Kerne blau, Sphäroplasten gelbrot, gelbe Kalkkörner dazwischen, Immersion.

Fig. 5. *Actinosphaerium.* Vitale Brillantkresylblaufärbung, konserviert mit Sublimat, Euparal. a) Strahlen, b) Körnchen besonders über der kontraktilen Vakuole (oben Leitz Oc. III Obj. 7).

Fig. 6. *Actinosphaerium.* Vitale Brillantkresylblaufärbung. Fixierung mit Sublimat, Nachfärbung der Kerne mit Karmin.

Fig. 7. *Actinosphaerium.* Vitale Brillantkresylblaufärbung bei Immersion. Erklärung im Text.

Fig. 8. *Aethalium septicum.* Plasmodium. Kull. Immers.

Fig. 9. *Plasmodiophora brassicae.* Heidenhain Immersion. a) Kerne, b) Pseudopodium mit Sphaeroplasten.

G. Pätz'sche Buchdr. Lippert & Co. G. m. b. H., Naumburg a. d. S.

Fig. 1.

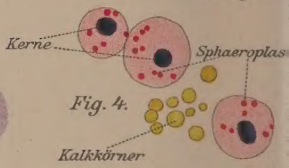


Fig. 4.

Fig. 2.

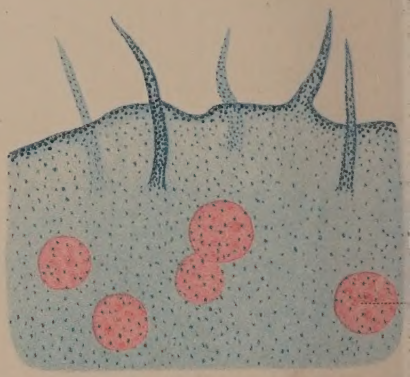


Fig. 6.

Fig. 3.

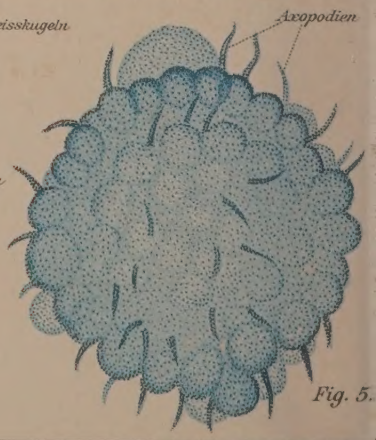


Fig. 5.

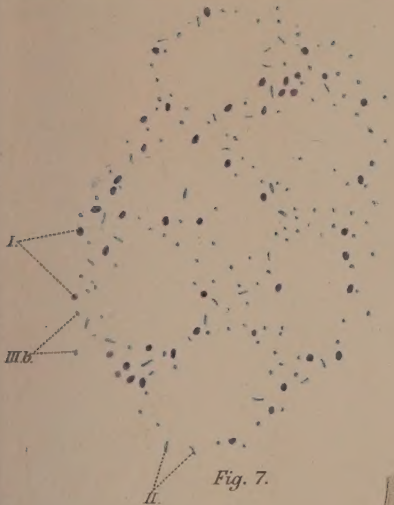


Fig. 7.

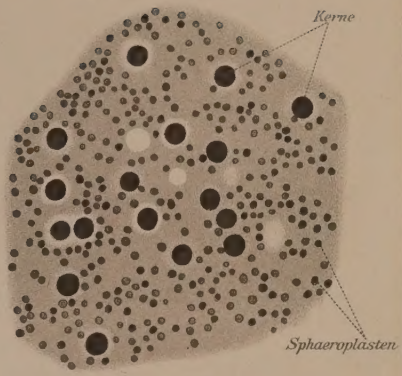


Fig. 8.

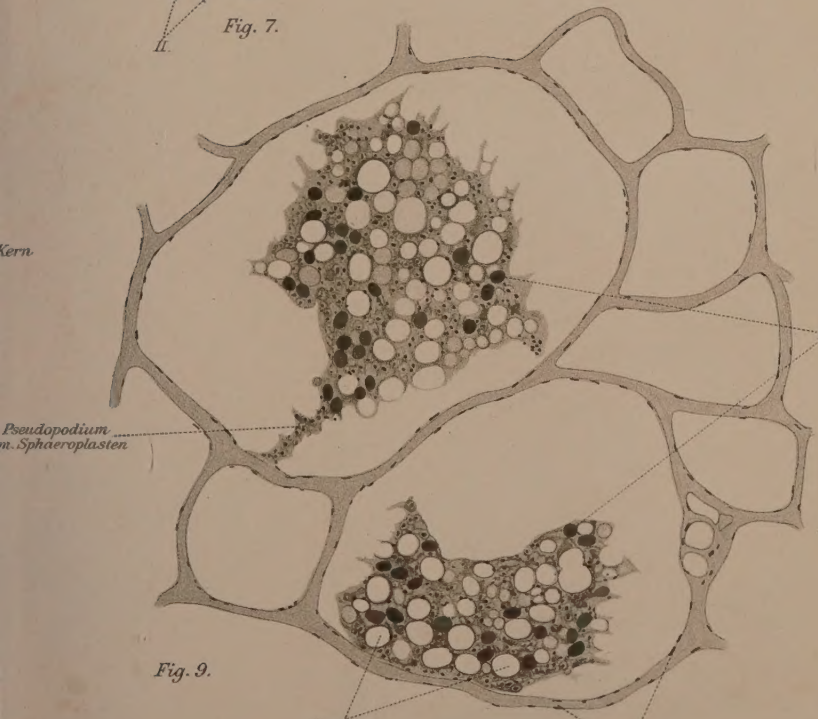


Fig. 9.

Fischer in Jena.
Lith. Anst. v. K. Weuser, Jena